

# **Transkription und posttranskriptionelle Regulation der EBER-Gene des Epstein-Barr-Virus während der Virusvermehrung**



vorgelegt von  
**Norbert Greifenegger**

im Juli 2001



**Transkription und posttranskriptionelle  
Regulation der EBER-Gene  
des Epstein-Barr-Virus  
während der Virusvermehrung**

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER  
NATURWISSENSCHAFTEN (DR.RER.NAT.) DER FAKULTÄT IV – CHEMIE  
UND PHARMAZIE DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von  
Norbert Greifenegger aus Aichach

2001

Promotionsgesuch eingereicht am: 16.Juli.2001

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Otto Wolfbeis

Prüfungsausschuss:

Vorsitzende: Prof. Dr. Claudia Steinem

Erstgutachter: Prof. Dr. Otto Wolfbeis

Zweitgutachter: PD Dr. Fritz Schwarzmann

Dritter Prüfer: Prof. Dr. Hans Robert Kalbitzer



meinen Eltern gewidmet

## Abkürzungen

|        |   |
|--------|---|
| AIDS   | <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>           |
| Amper  | Ammoniumpersulfat                                   |
| AS     | Anti-Sense  |
| BL     | Burkitt's-Lymphom                                   |
| Bp     | Basenpaar(e)  |
| BSA    | Rinderserum Albumin                                 |
| BS     | n-Buttersäure                                       |
| CMV    | Zytomegalovirus                                     |
| CTL    | Zytotoxische T-Lymphozyten                          |
| DEPC   | Diethylpyrocarbonat                                 |
| DIG    | Digoxigenin   |
| DNS    | Desoxyribonukleinsäure                              |
| dNTP's | äquimolare Mischung aus dATP, dTTP, dGTP und dCTP   |
| ds     | Doppelstrang  |
| DTT    | Dithiothreitol                                      |
| EA     | early antigen                                       |
| EBER   | Epstein-Barr-Virus-kodierte RNS                     |
| EBNA   | Epstein-Barr-Virus nukleäres Antigen                |
| EBV    | Epstein-Barr-Virus                                  |
| EDTA   | Ethylendiaminoessigsäure                            |
| eGFP   | verbessertes (enhanced) grünes Fluoreszenz -Protein |
| FKS    | fötales Kälberserum                                 |
| FISH   | <i>Fluorescent in situ Hybridisation</i>            |
| HCC    | hepatozelluläres Karzinom                           |
| HIV    | Humanes-Immunschwäche-Virus                         |
| HLA    | human leucocyte antigen                             |
| HSV    | Herpes-Simplex-Virus                                |
| IFN    | Interferon  |
| Ig     | Immunglobulin                                       |
| IL     | Interleukin   |
| IM     | Infektiöse Mononukleose                             |
| IR     | internal repeat                                     |
| kB(p)  | Kilobasen(paar)                                     |
| kDa    | Kilodalton  |

---

|                |   |
|----------------|---|
| LMP            | latentes Membranprotein   |
| M              | Molar   |
| m              | milli   |
| MHC            | major histocompatibility complex                                  |
| μ              | mikro   |
| MPS            | 3-Morpholinopropansulfonsäure                                     |
| mRNS           | Boten-( <i>messenger</i> ) -RNS                                   |
| NK             | <i>natural killer cells</i>                                       |
| NPC            | Nasopharynxkarzinom   |
| OHL            | orale Haarleukoplakie   |
| Ori            | <i>origin of replication</i>                                      |
| PBS            | <i>phosphat buffered saline</i>                                   |
| PCR            | Polymerase Kettenreaktion   |
| Pol            | Polymerase  |
| RNS            | Ribonukleinsäure  |
| RT             | Reverse Transkription   |
| PMSF           | <u>P</u> henyl- <u>M</u> ethyl- <u>S</u> ulfonyl- <u>E</u> luorid |
| PVP            | Polyvinylpyrolidon  |
| SDS            | Natriumdodecylsulfat  |
| ss             | Einzelstrang  |
| TAE            | Tris-Acetat-EDTA-Puffer   |
| Taq            | DNS-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>                       |
| Temed          | N,N,N',N', Tetramethylethylendiamin                               |
| TGF-β          | <i>Tumor Growth Factor β</i>                                      |
| T <sub>H</sub> | T-Helferzellen  |
| TPA            | 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat                              |
| TR             | terminal repeat   |
| Tris           | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                                   |
| Vol            | Volumen   |
| VCA            | Virus-Kapsid-Antigen  |
| VZV            | Varizella-Zoster-Virus  |

# Inhaltsangabe

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ABKÜRZUNGEN</b>  | <b>IV</b> |
| <b>INHALTSANGABE</b>  | <b>VI</b> |
| <b>ZUSAMMENFASSUNG</b>  | <b>IX</b> |
| <b>1 EINLEITUNG</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1.1 DAS EPSTEIN-BARR-VIRUS ALS MITGLIED DER HERPESVIREN</b>                        | <b>1</b>  |
| 1.1.1 VIRUSAUFBAU   | 1         |
| 1.1.2 INFEKTIONSWEG UND LEBENSZYKLUS  | 2         |
| 1.1.3 GENOMSTRUKTUR   | 3         |
| 1.1.4 TRANSKRIPTION OHNE VIRUSPRODUKTION (LATENZ)                                     | 6         |
| 1.1.5 TRANSKRIPTION IN DER PHASE DER PRODUKTIVEN VIRUSVERMEHRUNG                      | 9         |
| <b>1.2 POLYMERASE III UND DIE EBER-TRANSKRIPTE</b>                                    | <b>11</b> |
| 1.2.1 POLYMERASE III-VERMITTELTE TRANSKRIPTION  | 11        |
| 1.2.2 DIE EBER-TRANSKRIPTE  | 12        |
| <b>1.3 PROBLEMSTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT</b>  | <b>13</b> |
| <b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>  | <b>15</b> |
| 2.1.1 LÖSUNGEN UND PUFFER   | 15        |
| 2.1.2 STANDARD-DNS, STANDARD-RNS UND PROTEINSTANDARD                                  | 19        |
| 2.1.3 BAKTERIEN   | 19        |
| 2.1.4 PLASMIDE  | 20        |
| 2.1.5 ZELLINIEN   | 21        |
| <b>2.2 ARBEITEN MIT BAKTERIEN</b>   | <b>22</b> |
| 2.2.1 KOLONIERUNGEN IN <i>E. COLI</i>   | 22        |
| 2.2.2 SEQUENZIERUNG VON DNS   | 23        |
| <b>2.3 ARBEITEN MIT ZELLEN</b>  | <b>24</b> |
| 2.3.1 INDUKTION DES LYTISCHEN ZYKLUS VON EBV  | 24        |
| 2.3.2 KERNEXPORTHEMMUNG MIT LEPTOMYCIN B (LMB)  | 24        |
| 2.3.3 TRANSFEKTION EUKARYONTISCHER ZELLEN MITTELS ELEKTROPORATION                     | 24        |
| 2.3.4 DAS MACS-SEPARATIONSSYSTEM  | 24        |
| 2.3.4.1 Abtrennung der Zellen mit lytisch replizierendem EBV                          | 25        |
| 2.3.4.2 Abtrennung H2K <sup>K</sup> -transfizierter Zellen                            | 25        |
| 2.3.4.3 Fischen von EBER-1/2-RNA aus Gesamt-RNS                                       | 26        |
| 2.3.5 FLUORESZENZANALYSEN MIT HILFE DER DURCHFLUSSZYTOPHOTOMETRIE                     | 26        |
| 2.3.6 NUCLEAR RUN ON -EXPERIMENTE   | 26        |
| 2.3.7 PRÄPARATION VON PROTEINEXTRAKTEN AUS EUKARYONTISCHEN ZELLKERNEN                 | 27        |
| 2.3.8 FISH ( <i>FLUORESCENT IN-SITU HYBRIDISATION</i> ) ZUM NACHWEIS DER EBER-1/2-RNS | 28        |
| 2.3.9 RNS- PRÄPARATION  | 29        |
| 2.3.10 DNS-PRÄPARATION  | 29        |
| <b>2.4 ZELLFREIE ARBEITEN</b>   | <b>30</b> |

|  |    |
|--|----|
| 2.4.1 ELEKTROPHORESE VON NUCLEINSÄUREN                                       | 30 |
| 2.4.2 <i>NORTHERN BLOT</i> -ANALYSEN   | 31 |
| 2.4.3 DIG-NACHWEIS   | 32 |
| 2.4.4 <i>IN VITRO</i> TRANSKRIPTION (IVT)                                    | 32 |
| 2.4.5 VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE   | 35 |
| 2.4.5.1 Oligonukleotide für DNS-PCR aus genomischer DNS                      | 35 |
| 2.4.5.2 Oligonukleotide zur Amplifikation Plasmid-kodierter Sequenzen        | 36 |
| 2.4.5.3 Oligonukleotide für Quick Change-Mutationen                          | 36 |
| 2.4.5.4 Biotinylierte Oligonukleotide, Oligonukleotide zur DIG-Markierung    | 37 |
| 2.4.5.5 Oligonukleotide für RT-PCR, 3'-RACE und Sequenzierprimer             | 37 |
| 2.4.5.6 Oligonukleotide für EMSA   | 38 |
| 2.4.6 DIG-MARKIERUNG VON OLIGONUKLEOTIDEN                                    | 39 |
| 2.4.7 MARKIERUNG VON OLIGONUKLEOTIDEN MIT $\gamma$ -P <sup>32</sup> -ATP     | 39 |
| 2.4.8 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)  | 40 |
| 2.4.8.1 PCR  | 40 |
| 2.4.8.2 RT-PCR   | 41 |
| 2.4.8.3 Quick Change-Mutations PCR   | 42 |
| 2.4.8.4 3'-RACE  | 43 |
| 2.4.9 <i>PRIMER-EXTENSION</i> ZUR UNTERSUCHUNG DES 5'-ENDES EINER RNS        | 44 |
| 2.4.10 <i>RNASE-PROTECTION</i> ZUR UNTERSUCHUNG EINER VERKÜRZUNG DES 3'-ENDE | 45 |
| 2.4.11 DNASE I <i>IN VITRO FOOTPRINT</i>                                     | 45 |
| 2.4.12 <i>ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY</i> (EMSA)                    | 47 |

### **3 ERGEBNISSE** **49**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3.1 ANALYSE DER TRANSKRIPTIONSAKTIVITÄT VON EBER-1 UND EBER-2 IN EBV-POSITIVEN UND -NEGATIVEN ZELLEN</b>   | <b>49</b> |
| 3.1.1 KLONIERUNG EINES EBER-REPORTER-SYSTEMS  | 50        |
| 3.1.2 DIE AUFREINIGUNG ÜBER H2K <sup>K</sup> -OBERFLÄCHENMARKER FÜHRTE ZU POPULATIONEN MIT 95 % TRANSFIZIERTEN ZELLEN                                   | 54        |
| 3.1.3 <i>NUCLEAR RUN ON</i> -EXPERIMENTE ZEIGTEN EINE AKTIVE TRANSKRIPTION VON EBER-2, NICHT ABER VON EBER-1, IN ZELLEN MIT PRODUKTIVER VIRUSVERMEHRUNG | 58        |
| <b>3.2 ANALYSEN DER PROMOTOREN VON EBER-1 UND EBER-2</b>  | <b>62</b> |
| 3.2.1 SEQUENZIERUNG DER EBER-GENE DER EBV-STÄMME VON AKATA, P3HR1-13 UND -16, B95-8 UND RAJI ZEIGTEN WENIGE MUTATIONEN                                  | 62        |
| 3.2.2 DNASE I <i>FOOTPRINT</i> - ANALYSEN ERGABEN KEINE PROTEIN-BINDESTELLEN, DIE DIE REGULATION DER EBER-GENE ERKLÄREN KONNTEN                         | 63        |
| 3.2.3 THEORETISCHE NFW- UND GCF- BINDESTELLEN IN DEN PROMOTORBEREICHEN DER EBER-GENE  | 65        |
| 3.2.4 IDENTIFIZIERUNG VON NFW ALS TRANSKRIPTIONSFAKTOR IM PROMOTOR VON EBER-2 DURCH EMSA-EXPERIMENTE BESTÄTIGT  | 66        |
| <b>3.3 ANALYSE VON MODIFIKATIONEN DER EBER-TRANSKRIPTE, DIE DEREN FUNKTIONALITÄT BEEINFLUSSEN KÖNNTEN</b>   | <b>73</b> |
| 3.3.1 <i>NORTHERN BLOTTING</i> ZEIGTE UNTERSCHIEDLICHES LAUFVERHALTEN DER EBER-TRANSKRIPTE WÄHREND DER LATENZ UND DER PRODUKTIVEN VIRUSVERMEHRUNG       | 73        |
| 3.3.2 <i>PRIMER EXTENSION</i> -EXPERIMENTE ZEIGTEN KEINE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN LATENZ UND VIRALER REPLIKATION AM 5'-ENDE DER EBER-TRANSKRIPTE           | 75        |
| 3.3.3 <i>RNASE PROTECTION</i> -EXPERIMENTE ZEIGTEN KEINE UNTERSCHIEDE AM 3'-ENDES VON EBER-1 UND EBER-2 ZWISCHEN LATENZ UND VIRALER REPLIKATION         | 76        |

---

|   |            |
|---|------------|
| 3.3.4 3'- <i>RACE</i> ERGAB MODIFIKATIONEN VON EBER-1 UND EBER-2 BEIM ÜBERGANG VON DER VIRALEN LATENZ IN DIE VIRALE REPLIKATION | 78         |
| <b>3.4 LOKALISATION VON EBER-1 UND EBER-2 IN DER LATENZ UND IN DER REPLIKATIVEN PHASE VON EBV</b>                               | <b>80</b>  |
| 3.4.1 UNTERSCHIEDLICHE LOKALISIERUNG VON EBER-1 UND EBER-2 IN DER VIRUSLATENZ UND WÄHREND DER PRODUKTIVEN VIRUSVERMEHRUNG       | 80         |
| 3.4.2 DIE LOKALISATION DER EBER-TRANSKRIPTE IM ZELLKERN WAR VON VIRALEN PROTEINEN ABHÄNGIG                                      | 82         |
| 3.4.3 EBNA-1 UND / ODER LMP-2A MODULIERTEN DIE LOKALISATION DER EBER-TRANSKRIPTE  | 84         |
| 3.4.4 DER TRANSPORT DER EBER-TRANSKRIPTE VOM KERN IN DAS ZYTOPLASMA PRODUKTIV-INFIZIERTER ZELLEN IST EIN AKTIVER PROZESS        | 87         |
| <b>4 DISKUSSION</b>   | <b>91</b>  |
| <b>4.1 DIFFERENTIELLE EXPRESSION / REGULATION DER EBER-GENE BEIM ÜBERGANG VON DER LATENZ IN DIE VIRUSVERMEHRUNG</b>             | <b>91</b>  |
| <b>4.2 MOLEKULARE GRUNDLAGEN DER REGULATION DER EBER-GENE</b>   | <b>94</b>  |
| <b>4.3 PARADOXON – MODULATION DER FUNKTIONALITÄT</b>  | <b>97</b>  |
| <b>4.4 ZUSAMMENFASSUNG</b>  | <b>100</b> |
| <b>5 ANHANG</b>   | <b>102</b> |
| <b>6 LITERATURVERZEICHNIS</b>   | <b>112</b> |
| <b>LEBENS LAUF</b>  | <b>118</b> |
| <b>VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONGRESSE</b>   | <b>119</b> |
| <b>DANKSAGUNG</b>   | <b>120</b> |

---

## Zusammenfassung

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist in der Lage, in Abhängigkeit vom Typ und dem Differenzierungsgrad der Zelle, latent in der Form eines Episoms und ohne Produktion von infektiösen Nachkommenviren, zu persistieren. Alternativ vermehrt sich das Virus aktiv unter Zerstörung der Wirtszelle. EBER-1 und EBER-2 sind zwei kurze RNS-Transkripte, ohne CAP-Struktur und Poly-A-Schwanz, die während der viralen Latenz von der Polymerase III synthetisiert aber nicht translatiert werden. Eine Funktion der EBERs konnte bisher nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden, jedoch wurden diese RNS-Transkripte mit der Abwehr Interferon-induzierter antiviraler Effekte sowie der Regulation von Spleißvorgängen in Verbindung gebracht.

Dieser Arbeit lagen Vorarbeiten zugrunde, die zeigten, dass beim Übergang von der Latenz in die Virusvermehrung die Transkription von EBER-1 relativ zu der von EBER-2 herab reguliert wird <sup>27</sup>. Um eine mögliche Bedeutung dieser differentiellen Regulation für den EBV-Lebenszyklus zu verstehen, sollten zunächst die beteiligten molekularen Regulationsmechanismen untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigten *Nuclear Run On*-Experimente zur Bestimmung der Transkriptionsaktivität der EBER-Gene, dass die Aktivität des EBER-1-Gens nach Induktion der Virusvermehrung in gleicher Weise reguliert wird, wie die anderer Gene, die auch von der Polymerase III transkribiert werden. EBER-2 wird jedoch offenbar aktiv gegen diesen Trend weiter transkribiert. Bei der Suche nach Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, die möglicherweise an dieser Regulation beteiligt sind, wurde mittels EMSA- und *Footprint*-Techniken neben den bereits früher beschriebenen Faktoren Sp1 und ATF eine Bindestelle des Faktors NFW im Promotor von EBER-2 identifiziert. Es wurde beobachtet, dass NFW oder verwandte Faktoren, im Promotor von EBER-2 spezifisch in der Phase der Virusproduktion binden und somit die Transkription des Gens aufrecht erhalten könnten. Aber auch die Basalaktivität der EBER-Gene in der Latenz wurde durch virale oder virusinduzierte Faktoren erhöht. Reporterkonstrukte für die EBERs zeigten in EBV-positiven Zellen deutlich höhere Expressionen als in EBV-negativen Zellen.

Neben der Regulation der Transkription der EBERs sollte die Beobachtung näher untersucht werden, dass trotz Abschaltung von EBER-1 noch nach mehreren Tagen chemischer Induktion der viralen Replikation vergleichbare Mengen EBER-1-RNS in den Zellen gefunden wurden, wie in latent infizierten Zellen. Welchen Sinn sollte es ergeben, die Expression eines Gens abzuschalten, wenn sich im Gegenzug die Halbwertszeit der Transkripte stark erhöht? Zur

Überprüfung, ob dieses Paradoxon durch einen möglichen Verlust der Funktionalität der EBER-Transkripte, im speziellen der von EBER-1, erklärt werden könnte, wurden die molekularen Eigenschaften, die die Funktion beeinflussen, und die Lokalisation der EBERs in Zellen mit Virusreplikation untersucht.

Verglich man mittels *Northern Blot*-Experimenten die Laufeigenschaften der EBER-Transkripte aus der viralen Replikation mit denen der Latenz, so wiesen diese während der Virusproduktion eine verringerte elektrophoretische Mobilität auf. PCR-, *Primer Extension*-, *RNase Protection* und RACE-Untersuchungen ergaben aber keine Hinweise auf posttranskriptionelle Modifikationen auf Nukleotidebene. Vielmehr fanden sich begrenzte Nukleotidunterschiede, die möglicherweise die Ursache kovalenter Modifikation wie Methylierung oder Pseudouridinierung sein konnten. Die genauen Modifikationen konnte noch nicht ermittelt werden.

*In situ*-Hybridisierungen (FISH) zeigten eine weitere mögliche Regulation der EBERs auf. In latent infizierten Zellen befand sich EBER-1 im Zellkern und EBER-2 bevorzugt in den Nukleoli. In EBV-infizierten Zellen, in denen chemisch die Virusproduktion induziert wurde, befanden sich im Vergleich dazu beide Transkripte im Zytoplasma. Durch Transfektion eines Expressionsplasmids für EBERs in EBV-negativen Zellen konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation der Transkripte von EB-viralen Proteinen beeinflusst wird, da sie sich in nicht infizierten Zellen ebenfalls im Zytoplasma befanden. Kotransfektionsexperimente mit Expressionsplasmiden für virale Proteine der Latenz zeigten, dass das EBNA-1-Protein in der Lage war, EBER-2 im Zellkern zu lokalisieren. Expression des LMP-2A-Proteins führte zur Lokalisation beider EBER-Transkripte bevorzugt in den Nukleoli. Eine Wiederherstellung der Lokalisation wie in EBV-positiven Zellen war mit den beiden Proteinen aber nicht möglich, was dafür sprach, dass vermutlich noch andere Faktoren bei der Lokalisation der EBER-Transkripte eine Rolle spielen.

In uninfizierten Zellen konnte der Transport plasmidkodierter EBERs in den Zellen durch Leptomycin B gehemmt werden, nicht aber in virusinfizierten Zellen nach Induktion der Virusvermehrung. Der Export der EBER-Transkripte in das Zytoplasma war demnach ein aktiver Prozess der durch EB-virale Proteine gesteuert oder zumindest beeinflusst wird.

Die Zusammenhänge zwischen Regulation der Transkription der EBER-Gene, der hypothetischen Modifikation der Transkripte, der unterschiedlicher Lokalisation der EBERs in der Zelle und der Verlängerung deren Halbwertszeit werden in Bezug auf eine mögliche Regulation der Funktionalität der EBER-Transkripte diskutiert.



## 1 Einleitung

### 1.1 Das Epstein-Barr-Virus als Mitglied der Herpesviren

Die Familie der Herpesviridae, die etwa 100 verschiedene Arten umfasst, wird aufgrund der Architektur ihres Virions eingeteilt. Herpesviren werden anhand ihrer Biologie in drei Unterfamilien gegliedert <sup>66</sup>.

**Tabelle 1.1:** Die drei Unterfamilien der Herpesviren

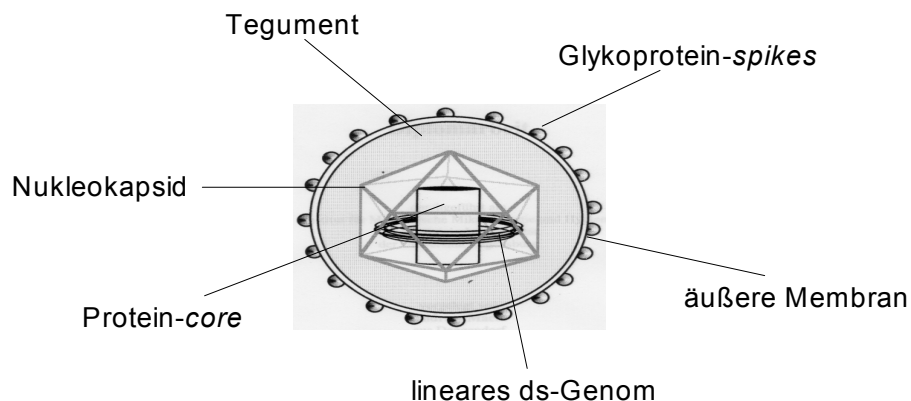
|   |   |
|---|---|
| Alphaherpesviridae (z. B. HSV-1, 2, VZV): | <ul style="list-style-type: none"><li>- breites Wirtszellspektrum</li><li>- kurzer Reproduktionszyklus</li><li>- schnelle Vermehrung in Zellkultur</li><li>- Zerstörung der infizierten Zellen</li><li>- Latenz in Ganglien</li></ul> |
| Betaherpesviridae (z. B. CMV):            | <ul style="list-style-type: none"><li>- eingeschränktes Wirtszellspektrum</li><li>- lange Vermehrungszeit</li><li>- langsame Vermehrung in Zellkultur</li><li>- Induktion von Riesenzellen</li></ul>                                  |
| Gammaherpesviridae (z. B. EBV):           | <ul style="list-style-type: none"><li>- sehr enges Wirtszellspektrum</li><li>- spezifisch für B- und T-Lymphozyten <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> auch in Epithelzellen</li></ul>  |

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) gehört zum Genus Lymphokryptovirus, das zu der Subfamilie Gammaherpesviridae gezählt wird <sup>42</sup>. EBV wurde 1964 von Epstein und Barr <sup>17</sup> sowie gleichzeitig von Pulvertaft <sup>63</sup> in einer lymphoblastoiden Burkitt's-Lymphom-Zelllinie entdeckt. Werner und Gertrude Henle identifizierten dieses Virus als neues Mitglied der Herpesvirusfamilie <sup>32</sup>; V. Diehl zeigte, daß EBV als Auslöser der Infektiösen Mononukleose (IM) auftritt <sup>33</sup>.

#### 1.1.1 Virusaufbau

Das Epstein-Barr-Virus besitzt die für Herpesviren charakteristische 120 nm große umhüllte Struktur. Diese setzt sich zusammen aus einem ikosaedrischen Kapsid aus 162 Kapsomeren, einem Protein-Viruskern (*core*) <sup>22</sup>, um den die lineare doppelstängige DNS gewickelt ist, eine

Tegumentschicht variabler Stärke, deren Funktion unbekannt ist <sup>75</sup>, und eine äußere Virusmembran (*envelope*), die sich aus Lipiden, Proteinen und Glykoproteinen zusammensetzt. Die Membran leitet sich von der Wirtsmembran ab und trägt externe Glykoprotein-*spikes* <sup>42</sup>, die als Bindestellen für zelluläre Rezeptoren dienen und somit den ersten spezifischen Kontakt zur Wirtszelle herstellen (siehe Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1:** Das Epstein-Barr-Virus

### 1.1.2 Infektionsweg und Lebenszyklus

Das Epstein-Barr-Virus wird hauptsächlich oral über Speichel von Infizierten auf nicht Infizierte übertragen. Weiterhin ist eine Weitergabe des Virus durch Blutprodukte oder Knochenmarktransplantationen möglich <sup>8;64</sup>.

Ein erstes mögliches Ziel im menschlichen Körper könnten periphere Epithelzellen der Tonsillen darstellen <sup>5</sup>. Hier vermehrt sich EBV lytisch, tritt dann in den Blutkreislauf über und infiziert dort seine eigentlichen Zielzellen, die B-Lymphozyten. Da Epithelzellen *in vitro* nur schlecht mit EBV infizierbar sind, gehen neuere Untersuchungen davon aus, dass (ruhende) B-Lymphozyten im Epithelgewebe das Ziel der Primärinfektion sind. Die Infektion erfolgt bei diesen Zellen über den zellulären Rezeptor CD21 (CR2) für Komplement C3d <sup>21</sup>. Das EBV-Glykoprotein gp350/220 besitzt eine starke Homologie zu C3d und ist für die Bindung an CD21 verantwortlich <sup>61</sup>. Die Interaktion zwischen CD21 und gp350/220 scheint jedoch nicht die einzige Eintrittspforte für EBV darzustellen. An polarisierten Epithelzellen wurde *in vitro* eine IgA-abhängige Infektion über einen polymeren IgA-Rezeptor beschrieben <sup>78</sup>. Eine weitere Eintrittsmöglichkeit für EBV stellt die Fusion von infizierten mit nicht infizierten Zellen dar <sup>5</sup>.

Für die Penetration der Wirtszelle ist neben einer Bindung durch gp350/220<sup>81</sup> das Glykoprotein gp85 zur Fusion von Virus- und Wirtsmembran notwendig<sup>91</sup>. Auch Ionenverschiebungen an Zellmembran und Virusmembran könnten daran maßgeblich beteiligt sein<sup>16</sup>. Nach Endozytose und Verschmelzung von Zell- und Virusmembran wird das Kapsid von EBV in das Zytoplasma entlassen<sup>60</sup>. Durch die Kernporen wird das Genom in den Zellkern eingeschleust und zirkularisiert<sup>75</sup>.

Von der viralen DNA werden drei Polypeptidgruppen kodiert, die kaskadenartig im Verlauf der Replikation synthetisiert werden: Als erstes werden die sehr frühen Gene (*immediate-early*) abgelesen, für deren Transkription keinerlei virale Proteine benötigt werden. Sie stellen regulatorische Proteine (Transaktivatoren) dar, deren Aufgabe in der Aktivierung der frühen Gene (*early*) besteht. Diese Gene kodieren für Proteine, die zur DNS-Synthese und zur Kontrolle des Wirtsstoffwechsels eingesetzt werden. Dann werden die späten Gene (*late*) aktiviert, die vorwiegend Strukturproteine darstellen. Nach der Produktion viraler Proteine wandern diese in den Zellkern zurück, um für den Viruszusammenbau (*assembly*) zur Verfügung zu stehen. Bei Ausschleusung der Viren aus der Zelle erhalten diese meist an der Kernmembran ihre Hüllmembran, die bei endgültigem Verlassen der Wirtszelle im Golgi-Apparat und Endoplasmatischem Retikulum weiter verändert wird<sup>14</sup>.

Im Laufe der latenten Transkription werden im Gegensatz zur lytischen Replikation keine (wie bei Herpes-Simplex-Virus) oder nur sehr wenige Proteine (Epstein-Barr-Virus) exprimiert. Das Virus wird als Pseudo-Chromosom von der befallenen Zelle an die Tochterzellen weitergegeben.

### 1.1.3 Genomstruktur

Das 172 kB große Genom von EBV besteht im Virion aus linearer, doppelsträngiger DNS<sup>3</sup>, die für etwa hundert Polypeptide kodiert. An beiden Enden befinden sich 4-12 Kopien von terminalen 0,5 kB großen Wiederholungssequenzen (*terminal repeats*; TR), während das übrige Genom durch vier interne Wiederholungssequenzen (*internal repeats*; IR1-IR4) in fünf Bereiche (*unique*; U1-U5) unterteilt wird, die nur einmal vorliegen (siehe Abbildung 1.1.3).

EB-virale Leserahmen werden nach Lage und Orientierung im Genom bezeichnet. Dazu wurde das Genom des Virus mit der Restriktionsendonuklease *Bam* HI zerschnitten, die entstandenen Fragmente kloniert<sup>2</sup> und ihrer Größe entsprechend mit Buchstaben bezeichnet. Gene, die auf so gekennzeichneten Fragmenten liegen, werden dementsprechend mit denselben Buchstaben

benannt. Leserahmen, die nach links orientiert sind, werden als *left frame*, die nach rechts, als *right frame* bezeichnet. So bedeutet BKRF1: *Bam* HI-Fragment K, erster Leserahmen (1) in rechter Orientierung (frame).

Zwei Startpunkte der Replikation konnten im EBV-Genom identifiziert werden. Der *Origin of Replication* OriP wird im latenten Zyklus des Virus benutzt und ist auf dem BamHI C-Fragment lokalisiert <sup>92</sup>. Er besteht aus 20 Wiederholungen einer Bindestelle für das virale Protein EBNA-1 und vier weiteren ungefähr 1 kB entfernt gelegenen Wiederholungen dieser Bindungsstelle (*dyad symmetry element*). Der OriLyt hingegen, der in der Nähe der *Pst* I- und *Not* I-Sequenzwiederholungen liegt, kommt in der lytischen Replikation zum Einsatz <sup>28</sup> (siehe Abbildung 1.1.3).



### 1.1.4 Transkription ohne Virusproduktion (Latenz)

Das Epstein-Barr-Virus kann B-Lymphozyten latent infizieren. In diesen Zellen persistiert das Virus ohne Produktion von neuen, infektiösen Partikeln. Hierbei werden vom Virus im Gegensatz zum produktiven (lytischen) Zyklus nur eine geringe Anzahl an Proteinen exprimiert. Ein Großteil dieser Proteine (siehe Abbildung 1.1.3) trägt zur Immortalisierung der Wirtszelle bei. Voraussetzung für die Immortalisierung der B-Zellen ist die Zirkularisierung des linearen EBV-Genoms zu einem Episom im Zellkern der Wirtszelle <sup>42</sup>. Diese Zirkularisierung findet ungefähr 8 bis 20 Stunden nach der Infektion statt <sup>36</sup>.

**EBER-1 und EBER-2** sind nicht-polyadenylierte, untranslatierte RNS-Moleküle von 167 und 172 Basen ohne CAP-Struktur <sup>11</sup>, die von der zellulären RNS-Polymerase III in sehr großen Mengen (circa  $10^7$  Moleküle pro Zelle) produziert werden <sup>46</sup>. Beide RNS-Moleküle besitzen eine charakteristische, hochkonservierte Sekundärstruktur und sind hauptsächlich im Zellkern der Wirtszelle lokalisiert <sup>35</sup>. Ihre Transkription wird beim Übergang von der Latenz in die virale Replikation reguliert <sup>27</sup> (siehe auch Kapitel 1.1.3).

**EBNA-1** ist ein DNS-bindendes Protein und bindet als Dimer sequenzspezifisch im latenten OriP des Virus <sup>1</sup>. Nach der DNS-Bindung wechselt das EBNA-1-Dimer die Konformation, bringt die zwei Elemente (siehe Kapitel 1.1.3) des *origins* nahe zusammen und verdreht die DNS. EBNA-1 wirkt als Transkriptionsfaktor und hält den episomalen Status des EBV-Genoms in der infizierten Zelle aufrecht <sup>57</sup>. Gleichzeitig stellt es einen Replikations- und Transkriptionsfaktor für latente EBV-Transkripte dar, die vom Cp-Promotor aus gestartet werden. EBNA-1 ist das einzige Protein von EBV, das in jeder EBV-infizierten sich teilenden Zelle exprimiert wird.

**EBNA-2** wirkt als Transkriptionsfaktor und aktiviert den Promotor des LMP-1-Gens von EBV und vieler anderer zellulärer Gene, wie zum Beispiel des B-Zell-Aktivierungsmarkers CD23 <sup>26;89</sup>. EBNA-2 bindet DNS nicht direkt, sondern tritt mit dem DNS-bindenden Protein RBP-Jκ in Wechselwirkung <sup>31</sup>. EBNA-2 wird sehr früh nach Infektion der Wirtszelle exprimiert und scheint das Schlüsselprotein zur Immortalisierung der Wirtszelle darzustellen. Durch die Transaktivierung von LMP-1 setzt EBNA-2 den eigentlichen Immortalisierungsprozeß in Gang <sup>38</sup>. Hierbei reagiert es mit dem Transkriptionsfaktor PU 1, der eine Bindungsstelle im LMP-1-Promotor besitzt <sup>37</sup>. Eine weitere wichtige Funktion ist der Wechsel vom EBNA-Promotor Wp (in hoher Kopienzahl im IR1 vorhanden) zum EBNA-Promotor Cp (U1-Region).

**EBNA-LP** (= EBNA-5) startet von der 5'-kodierenden Sequenz einer bicistronischen mRNS. Das Translations-Initiationskodon wird durch ein Spleiß-Ereignis nahe dem 5'-Ende gebildet <sup>72</sup>. Bisher ist nur bekannt, daß EBV-Stämme (Daudi), denen im EBNA LP-Gen die letzten zwei Exons fehlen, mit geringerer Effizienz B-Zellen immortalisieren, als Stämme mit vollständigem EBNA-LP <sup>28;54</sup>. Dies läßt auf eine wichtige Rolle beim Immortalisierungsprozeß in B-Lymphozyten schließen. Darüber hinaus induziert EBNA-LP zusammen mit EBNA-2 das Zyklin D2, das nach Virusinfektion für den Wechsel der Zelle von der G0-Phase zur G1-Phase - und somit für die Zellaktivierung - mitverantwortlich ist <sup>77</sup>.

**EBNA-3A, -3B und -3C** (= EBNA-3, -4, -6) stellen eine Familie von Genen dar, die nahe verwandt sind. Alle besitzen ähnliche Exon/Intron-Strukturen, teilweise übereinstimmende Proteinsequenzen im aminoterminalen Bereich und verschiedenartig aufgebaute Wiederholungssequenzen am carboxyterminalen Ende. Es gibt Hinweise, dass EBNA-3A nur sehr früh nach Infektion für den Immortalisierungsprozeß wichtig ist <sup>39</sup>. Versuche mit rekombinant hergestellten Proteinen der EBNA-3-Familie zeigten, dass EBNA-3A und -3C essentiell für Immortalisierung und Auswachsen von lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) sind <sup>86</sup>, während EBNA-3B hierfür nicht erforderlich ist <sup>85</sup>.

**LMP-1** besteht aus einem kurzen hydrophilen Aminoterminal, sechs hydrophoben Transmembrandomänen und einem langen hydrophilen Carboxyterminus. Es zeigt somit den charakteristischen Aufbau eines Transmembranproteins <sup>47</sup>. Zusätzlich konnten für LMP-1 Ähnlichkeiten zu Ionenkanal-Strukturen beschrieben werden. Es existiert in einer längeren (Viruslatenz) und einer verkürzten (produktive Virusvermehrung) Form <sup>53</sup>. LMP-1 formt zusammen Komplexe auf der Oberfläche von lymphoblastoiden Zelllinien <sup>49;93</sup>. LMP-1 ist das einzige für die Immortalisierung notwendige Protein bei EBV, für das zweifelsfrei onkogenes Potential beschrieben wurde <sup>88</sup>. Die verkürzte Form von LMP-1 konnte im Epstein-Barr-Virion nachgewiesen werden und könnte deswegen essentiell bei der Initiation der Immortalisierung sein <sup>53</sup>. LMP-1 steigert die Expression einiger Adhäsions-Moleküle auf der Oberfläche von B-Zellen <sup>90</sup>, des Protoonkogens bcl-2 <sup>30</sup> und einer Kalzium-abhängigen Protein-Kinase <sup>59</sup>, die eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der B-Zellen spielt.

**LMP-2A/2B** werden aufgrund ihrer Leserahmen, die über die TR von EBV laufen und somit nur im episomalen Zustand transkribiert werden <sup>45;73</sup>, auch *terminal protein 1* und 2 (Tp-1, -2) genannt. LMP-2A und LMP-2B unterscheiden sich nur durch die Anwesenheit eines Exons im 5'-Bereich. LMP-2B, dem das 5'-Exons fehlt, stellt möglicherweise einen negativen Regulator

zu LMP-2A dar. Beide besitzen zwölf hydrophobe Membrandomänen und konnten auf der Oberfläche der Plasmamembran in enger Assoziation mit LMP-1 gefunden werden <sup>50</sup>. LMP-2A/2B sind an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten phosphoryliert <sup>49</sup> und interagieren mit fyn, lyn und anderen Tyrosinkinasen aus der src-Familie <sup>7</sup>. Diese Beobachtungen deuten auf eine Rolle von LMP-2A/2B bei der transmembranen Signalübertragung hin. Beide sind jedoch, wie in Deletionsexperimenten gezeigt wurde, nicht für die Immortalisierung von B-Zellen nötig <sup>51</sup>. Die Aufgabe von LMP-2A liegt scheinbar vielmehr darin, antagonistisch gegen den Kalzium-mobilisierenden Effekt des aktivierten B-Zell-Rezeptors zu wirken, um somit die Aktivierung von B-Zellen, beispielsweise durch antigenvermittelte Quervernetzung membranständiger Ig Moleküle, zu verhindern und die Latenz aufrecht zu erhalten <sup>58</sup>.

**BARF 0** (B95-8-Stamm) und **BARF 1** (Wildtyp-EBV) Transkripte könnten ein basisches 33 kDa-Protein, sehr wahrscheinlich einen Transkriptionsfaktor, kodieren, der 40 % Homologie zur DNS-Binderegion des ICP4-Transkriptionsfaktors von Herpes simplex zeigt <sup>9</sup>.

Nicht jede latent-infizierte B-Zelle zeigt das gleiche Genexpressionsmuster. Es lassen sich vier verschiedene Latenzformen (LAT 0-III) unterscheiden:

In **LAT I** werden nur EBNA-1-, EBER-1-, EBER-2- und BARF-0-Transkripte exprimiert. EBNA-1 wird hier von einem autoregulierten Promotor im *Bam* HI-Q-Fragment (Q-Promotor) gestartet <sup>71</sup>. Burkitt's-Lymphom-Biopsien und frische periphere Blutlymphozyten von gesunden Seropositiven zeigen dieses Expressionsmuster.

Derselbe Transkriptionsstart von EBNA 1 wird auch in **LAT II** benutzt (Q-Promotor). Jedoch können in dieser Latenzform zusätzlich zu EBNA-1-, EBER- und BARF-0-Transkripten auch LMP-1, LMP-2A- und LMP-2B nachgewiesen werden. Dieses Expressionsmuster wird in Biopsien von Nasopharynxkarzinomen und Hodgkin-Lymphomen nachgewiesen <sup>8;56</sup>.

In **LAT III** werden alle bekannten latenten EBV-Proteine exprimiert: EBER-1/2-, EBNA-1 bis -6-, LMP-1-, LMP-2A/2B- und BARF-0-Transkripte können nachgewiesen werden. Früh nach der Infektion wird zur Transkription der EBNA-Gene der Promotor Wp, der im *Bam* HI-W-Fragment lokalisiert ist, benützt und wechselt nach ungefähr 12 Stunden zum Cp-Promotor <sup>65</sup>. Der Fp-Promotor ist in dieser Latenzform inaktiv <sup>70</sup>. Dieses Latenzprogramm ist sehr gut in lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) in Zellkultur zu beobachten, in der die infizierten B-Lymphozyten keinerlei Immundruck durch CTL oder NK-Zell-Antworten ausgesetzt sind. *In vivo* spielt diese Latenzform wohl die entscheidende Rolle zur Etablierung der Latenz bei Erstinfektion. Jedoch werden diese hochimmunogenen LAT III-Zellen im Verlauf der Erstinfektion vom Immunsystem erkannt und zerstört.



Einige infizierte Zellen scheinen ein anderes zellulär- und viral-kodiertes Programm zu besitzen, das es ihnen erlaubt, im Körper unerkannt vom Immunsystem zu persistieren. Es handelt sich dabei um ruhende B-Zellen, vermutlich Gedächtniszellen, die ein Expressionsmuster vom Typ **LAT 0** zeigen und in denen nur die m-RNS für LMP2A nachgewiesen werden konnte<sup>64</sup>.

### 1.1.5 Transkription in der Phase der produktiven Virusvermehrung

Die Expression EB-viraler Proteine kann in eine aus drei Schritten bestehende Kaskade eingestuft werden: Sehr frühe Transkription, frühe Transkription und späte Transkription (*immediate-early*, *early* und *late*).

Die Produkte der ***immediate-early*-Gene** leiten die lytische Phase (Virusproduktion) ein und stellen Transaktivatoren auf Transkriptionsebene dar. Bisher sind drei Genprodukte mit dieser Funktion beschrieben. Diese werden von den Leserahmen BZLF-1, BRLF-1 und BLRF-4 kodiert. Sie schalten zum einen die Gene der Latenz - wie die EBNA-Promotoren und den LMP-Promotor - ab, zum anderen aktivieren sie die Gene der frühen (*early*) Phase<sup>41</sup>. Die Gene der sehr frühen (*immediate-early*) Phase können als einzige Proteine ohne die Synthese anderer Virusproteine exprimiert werden.

Der **BZLF-1**-Transaktivator (Zta, ZEBRA, EB1) steht am Anfang der Aktivierungskaskade des lytischen Zyklus. Dieses Genprodukt ist neben Rta in der Lage, latent-infizierte B-Lymphozyten in den lytischen Replikationszyklus überzuleiten<sup>12</sup>. Für BZLF1 konnte bisher eine direkte positive Regulation für den BSLF-2 / BMLF-1-Promotor<sup>40</sup>, den bidirektionellen Ori-lyt-Promotor<sup>13</sup> und für den BZLF-1-Promotor selbst<sup>19</sup> beschrieben werden. Zta weist eine DNS-Bindungsdomäne auf, die Homologien zu c-fos besitzt, bindet spezifisch an AP-1-Stellen<sup>87</sup> und zeigt ein *coiled-coil*-Motiv, das eine Dimerisierung ermöglicht. BZLF-1 kann von den zwei verschiedenen Promotoren Zp und Rp abgelesen werden, wobei Zp ein 0,9 kB großes Transkript liefert, während Rp ein bicistronisches Transkript aus BZLF-1 und BRLF-1 entstehen läßt<sup>52</sup>. Der Zp-Promotor ist selbst durch eine Vielzahl von Mechanismen reguliert: Positiv regulatorische, durch TPA induzierbare Elemente<sup>18</sup> wurden ebenso beschrieben, wie *cis*-aktive negativ regulatorische HI-Motive<sup>74</sup>. Ein weiterer negativ-regulatorischer, posttranskriptioneller Mechanismus, der auf einer „*antisense*-Regulation“ von BZLF1 beruht, konnte ebenfalls beschrieben werden<sup>62</sup>. Das Zta-Protein ist stammabhängig 29 bis 40 kDa groß.

**BRLF-1** (Rta) wird von einer bicistronischen m-RNS der Leserahmen BZLF1 und BRLF1 translatiert. Seine Expression wird von Zta noch gesteigert. Rta wirkt transaktivatorisch auf verschiedene Promotoren, wie etwa den Promotor des frühen BMLF1-Genprodukts <sup>29</sup>. Die Wirkung von Zta auf *enhancer*-Elemente im BMLF1-Promotor wird von Rta gesteigert. Beide Transaktivatoren - Zta und Rta - verstärken sich gegenseitig in ihrer Wirkung <sup>29</sup>. Rta ist ein 94/98 kDa großes Protein.

Der dritte bekannte Transaktivator der sehr frühen Phase ist **BI'LF4** (I'ta). Dieses Protein ist für den Übergang in die lytische Phase nicht unbedingt notwendig, da auch bei den Zellen, die mit dem EBV-Stamm B95-8 mit einer Deletion im I'ta-Bereich immortalisiert wurden, eine lytische Replikation zu beobachten ist. Es wird vermutet, daß BI'LF4 nur in Zellen z.B. einer bestimmten Differenzierungsstufe exprimiert wird. I'ta beeinflusst den BMLF-1-Promotor sowie seinen eigenen Promotor positiv <sup>55</sup>.

Zu der **frühen Stufe** der Virusreplikation zählen circa 30 Proteine, die vor der Replikation der viralen DNS exprimiert werden. Sie werden durch die sehr frühen Proteine induziert. Dazu gehören u.a.: das BMLF-1-Protein, das die Translationsrate einiger Gene erhöht <sup>40</sup>, die virale DNS-Polymerase, die nur in der lytischen Phase benutzt wird, DNS-bindende Proteine (z.B. p110) und andere Proteine der Replikation und des Nukleotidstoffwechsels.

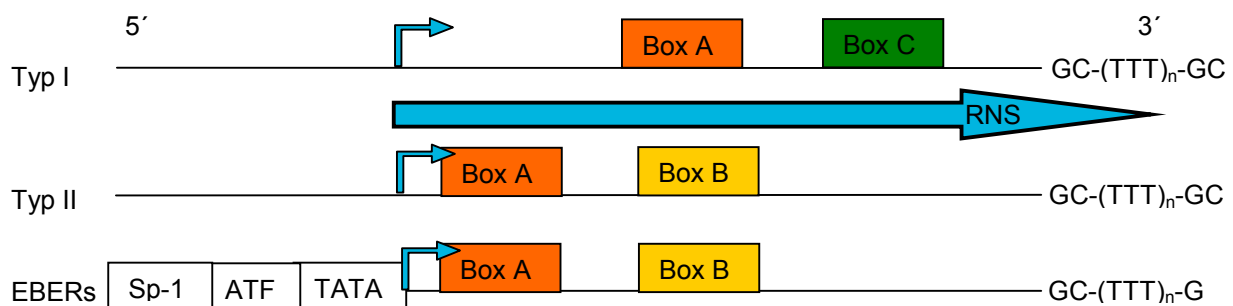
In der **späten Phase** werden ungefähr 40 Strukturproteine und die für das *Virus-assembly* wichtigen Faktoren produziert. Sehr bedeutend sind hierbei das Hauptmembranprotein BRLF-1 (gp350/220), das virale Kapsidprotein (BcLF-1: p150: VCA) und das Tegumentprotein BNRF-1.

## 1.2 Polymerase III und die EBER-Transkripte

Gegenstand der Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit sind die Regulation und der Metabolismus der EBER-Transkripte. Da diese EB-viralen Transkripte im Gegensatz zu den anderen viralen Genen von der Polymerase III synthetisiert werden <sup>67</sup>, wird nachfolgend kurz auf die charakteristischen Merkmale der Polymerase III -vermittelten Transkription eingegangen.

### 1.2.1 Polymerase III-vermittelte Transkription

Die Polymerase III ist mit 9-15 Untereinheiten eines der komplexesten Proteine und transkribiert vor allem kleine nicht polyadenylierte RNS, wie tRNS, 5S RNS, 7SK, 7SL, U6 und 4,5S <sup>24</sup>. Im Gegensatz zur Polymerase II, bei der die regulatorischen Elemente immer im Promotorbereich vor der codierenden Sequenz liegen, sind die konservierten regulatorischen Elemente bei der Polymerase III innerhalb der codierenden Sequenz lokalisiert. Es gibt jeweils zwei Boxen (Box A und Box C: Typ 1-Promotor und Box A und Box B: Typ 2-Promotor), die die Transkription regulieren <sup>20</sup>. Box A ist für die korrekte Positionierung der Transkriptionsmaschinerie verantwortlich, Box B (bzw. Box C) für die Effektivität der Transkription. Auch das Beenden der Transkription ist zwischen Polymerase II und III unterschiedlich gesteuert. Die Transkription bei Polymerase II wird durch Abfallen der Polymerase beendet (Terminationssignal unbekannt) und das spätere 3'-Ende wird erst durch Anhängen des Poly-A-Schwanzes an der Poly A-Site spezifiziert. Die Transkripte von Polymerase III besitzen dagegen keinen Poly-A-Schwanz. Die Transkription der Polymerase III wird durch mehrere Tyrosine (>4), die von GC-reichen Regionen flankiert sind, terminiert (siehe Abbildung 1.2).



**Abbildung 1.2: Konservierte regulatorische Elemente von Polymerase III-transkribierten Gene.** Die EBER-Transkripte sind den Typ II-Transkripten verwandt und besitzen zusätzlich zu Box A und B noch essentielle regulatorische Elemente der Polymerase II-Transkription (Bindestellen für Sp1 und ATF, sowie eine TATA-Box).

### 1.2.2 Die EBER-Transkripte

Die EBER-Gene unterscheiden sich von den anderen Polymerase III-transkribierten Genen bezüglich ihrer regulatorischen Elemente. Hier kommen zu den internen Boxen A und B noch regulatorische Elemente der Polymerase II vor der kodierenden Sequenz hinzu. Durch Deletionen, die immer näher an den Startpunkt der codierenden Sequenzen der Gene heranreichten, wurde gezeigt, dass die EBERs in *in vitro* Transkriptionen geringere Expression aufwiesen, je mehr vor der codierenden Sequenz weggenommen wurde. Vor den Genen wurden mit *footprint* und EMSA die Bindestellen für Sp1 und ATF, zusammen mit einer TATA-Box identifiziert, welche für die Transkription der EBER-Gene essentiell sind <sup>34</sup>. Wie Polymerase III auf die regulatorischen Elemente der Polymerase II reagieren kann ist ungeklärt.

Die Lokalisierung der EBER-Transkripte wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung von Klein wurde die unterschiedliche Lokalisierung von EBER-1 und EBER-2 im Zellkern bzw. in den Nukleoli latent-infizierter B-Lymphozyten beschrieben <sup>82</sup>. Die Behandlung von EBV-positiven Zellen mit Interferon führt zu einer Verminderung der Transkription der EBER-Gene, aber gleichzeitig auch zu einer Erhöhung der Halbwertszeit <sup>11</sup>. Es sind nur wenige Fälle EBV-infizierter Zellen bekannt, bei denen die EBER-Transkripte nicht hergestellt werden. Dazu gehört die orale Haarleukoplakie <sup>6</sup>, das hepatozelluläre Karzinom (HCC) <sup>79</sup> und bestimmte Arten von Brustkrebs <sup>25</sup>.

Die Funktion der EBER-Transkripte ist noch weitgehend ungeklärt. Es gibt Untersuchungen, bei denen eine Kolo-kalisation von EBER-1 mit L-22 gefunden wurde <sup>84</sup>. L-22 ist ein ribosomales Protein und ist vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert. EBER-1 lagert L-22 in EBV-positiven Zellen in den Zellkern um und verhindert hiermit eine Einbindung von L-22 in die Ribosomen. Dies führt in EBV-positiven Zellen zu einer vermehrten Expression von L-22. Manipulationen am L-22-Gehalt von Zellen, sowie anderen Komponenten der Translationsmaschinerie, haben transformierende Eigenschaften, d.h. die EBER-Transkripte könnten an der Transformation von EBV-infizierten Zellen beteiligt sein. Auch eine Bindung an das LA-Antigen wurde berichtet <sup>46</sup>.

In Analogie zu den VA-Transkripten von Adenovirus wurde auch eine Wechselwirkung mit der DAI-Kinase gefunden <sup>10</sup>. Die DAI-Kinase wird durch Interferon induziert und durch doppelsträngige RNS aktiviert. Eine Aktivierung der DAI-Kinase hat eine Phosphorylierung des eIF-2-Faktors zur Folge, wodurch die Initiation der Translation verhindert wird. Die Bindung der EBER-Transkripte durch die Kinase verhindert deren Aktivierung. Dies weist auf eine mögliche Rolle der EBER-Transkripte in der Blockierung dieses Anti-viralen Mechanismus über die DAI-

Kinase hin. Im Gegensatz zu einer Deletion der VA-Transkripten von Adenovirus, die zu einer Sensitivität von infizierten Zellen gegenüber Interferon führt, hat eine Deletion der EBER-Transkripte keinen Einfluss auf die Modulation der Interferon-induzierten Immunantwort<sup>80</sup>.

Eine weitere mögliche Funktion liegt in der Aktivierung der 5'-2'-Polyadenylatsynthetase<sup>76</sup>. Diese Synthetase wird auch durch Interferon induziert und durch doppelsträngige RNS aktiviert. Auch die EBER-Transkripte können die 5'-2'-Polyadenylatsynthetase anschalten, was zum Abbau von polyadenylierten RNS-Transkripten durch die RNase L führt. Ein Abbau von zellulärer mRNA könnte in frühen Phasen der Infektion einen Vorteil für EBV darstellen.

Eine neuere Untersuchung weist auch darauf hin, dass die Expression der EBER-Transkripte eine höhere Expression von IL-10 zur Folge hat<sup>43</sup>. Die Expression von EBER-1 in EBV-negativen Akata-Zellen führt zu einer Erhöhung der IL-10 Expression. Dieses IL-10 dient bei EBV-positiven Zellen, die in Mangelmedium kultiviert werden, als Wachstumsfaktor. Auch sind EBV-negative Akata-Zellen, die die EBERs exprimieren, in SCID-Mäusen tumorgener als EBV-negative Akatas die keine EBER-Transkripte herstellen.

Andererseits bewirkt IL-10 eine Verschiebung im Verhältnis von  $T_{H1}$  /  $T_{H2}$  hin zu  $T_{H2}$  bei T-Helferzellen, was zu einer Abschwächung der zellvermittelten Immunantwort (CTL) gegen EBV führt.

### **1.3 Problemstellung und Ziel der Arbeit**

Die Funktion der EBER-Transkripte in EBV-infizierten Zellen ist noch immer unklar. In Vorarbeiten wurde herausgefunden, dass EBER-1 beim Übergang von der Latenz in die replikative Phase abgeschaltet wird, nicht aber EBER-2. Es wurde daher vermutet, dass EBER-1 möglicherweise an der Umschaltung von der Latenz des Virus zur produktiven Vermehrung beteiligt sein könnte. Alternativ könnte die Expression nicht mit der produktiven Vermehrung des Virus vereinbar sein. Zudem war nicht klar, ob es sich um eine gezielte Abschaltung des einen EBER-Gens oder um eine gezielte Überexpression des Anderen handelte. Eine genauere Aufklärung der Regulation der EBER-Transkripte sollte zu einem besserem Verständnis der Funktion führen. Mit DNase I *Footprint*- Versuchen und EMSA-Experimenten sollten die Faktoren gefunden werden, die diese differentielle Regulation veranlassen. Desweiteren sollte ein Reporter für die EBER-Transkripte hergestellt werden, mit dem es möglich sein sollte, die

Ergebnisse der *Footprint*- Versuche und EMSA-Experimente in einem funktionellem Assay zu bestätigen.

Die Vorarbeiten führten noch zu einer weiteren interessanten Beobachtung: obwohl nachgewiesen wurde, dass EBER-1 beim Übergang von der Latenz in die replikative Phase abgeschaltet wird, war nach Induktion der Virusvermehrung keine verringerten EBER-1- RNS-Mengen zu erkennen. Welchen Sinn sollte es ergeben, die Transkription einer RNS abzuschalten, wenn sich deren Halbwertszeit gleichzeitig stark erhöht? Lässt sich diese scheinbare Paradoxon durch einen Verlust an Funktionalität erklären?

Da die Funktionalität der EBER-Transkripte bis zu diesem Zeitpunkt noch unklar war, sollten die Transkripte auf Nukleotidebene untersucht werden, ob sich hier Unterschiede feststellen lassen. Mit unterschiedlichen Methoden (*Primer Extension*, *RNase Protection* und *3'-RACE*) sollte die Sequenz der Transkripte aus Latenz und lytischer Phase geprüft werden.

Ein weiterer Punkt, der das Paradoxon klären könnte, war die Lokalisation der EBER-Transkripte in latent und lytisch infizierten EBV-positiven Zellen. Diese Lokalisation sollte mit FISH-Experimenten untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1.1 Lösungen und Puffer

In der folgenden Tabelle 2.1.2 sind die verwendeten Puffer und Lösungen zusammengefasst.

**Tabelle 2.1.2:** Lösungen und Puffer

| Methode            | Lösung                                       | Zusammensetzung  |
|--------------------|--|--|
| allgemein          | 10 x Auftragspuffer für Agarosegele und EMSA | je 0,25 % Xylene Cyanol FF und Bromphenolblau<br>40 % Glycerin   |
|                    | DEPC-behandeltes Wasser                      | 1 ml Diethyl-Pyrocbonat auf 1 l Wasser, autoklavieren (zur Inaktivierung von Nukleasen)  |
|                    | TAE  | 40 mM Tris<br>20 mM NaAcetat<br>2 mM EDTA pH 8,3   |
|                    | TBE  | 100 mM Tris<br>100 mM Borsäure<br>2 mM EDTA pH 8,3   |
|                    | PBS  | 648 mM NaCl<br>13 mM KCl<br>20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O<br>7,3 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>4,5 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O<br>2,5 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O |
|                    | PBS*   | PBS ohne CaCl <sub>2</sub> und MgCl <sub>2</sub>   |
| Bakterienkultur    | LB-Medium                                    | 10 g Trypton<br>5 g Hefeextrakt<br>10 g NaCl<br>ad 1 l H <sub>2</sub> O bid. pH7,0 mit NaOH  |
| Isolierung von DNS | S1   | 50 mM Tris/HCl pH 8,0<br>10 mM EDTA<br>100 µg RNase A /ml  |
|                    | S2   | 200 mM NaOH<br>1 % SDS   |
|                    | S3   | 2,8 M KAc pH 5,1   |

| Methode   | Lösung                         | Zusammensetzung   |
|---|--------------------------------|---|
| Kompetente Bakterien                              | Puffer A                       | 10 mM MPS /NaOH pH 7,0<br>10 mM RbCl  |
|   | Puffer B                       | 10 mM MPS /NaOH pH 6,5<br>50 mM CaCl <sub>2</sub>   |
| DIG-Detektion                                     | 10 x Blocking-Puffer           | 10 g Blocking-Reagenz (Roche) in<br>100 ml DIG-Puffer 1   |
|   | DIG-Puffer 1                   | 100 mM Maleinsäure<br>150 mM NaCl<br>pH 7,5 mit NaOH einstellen   |
|   | DIG-Puffer 2                   | DIG-Puffer 1 mit 0,3 % Tween 20   |
|   | DIG-Puffer 3                   | 100 mM Tris/HCl pH 9,5<br>100 mM NaCl   |
| FISH  | FISH-Hybridisierungspuffer     | 50 % Formamid<br>3 x SSC<br>10 % Dextransulfat<br>0,1 % Polyvinylpyrrolidon<br>0,1 % Ficoll 400<br>0,025 % SDS<br>10 mM Tris/HCl pH 8<br>1 mM EDTA pH 8,5 |
|   | FISH-Nachhybridisierungspuffer | 60 % Formamid<br>2 x SSC  |
|   | FISH-RNase-Puffer              | 50 µg RNase A pro ml FISH-Nachhybridisierungspuffer   |
|   | FISH-Blocking-Puffer           | 1,5 % Blocking-Reagenz (Roche)<br>in TBS  |
|   | TBS                            | 0,15 M NaCl<br>10 mM Tris/HCl pH 7,5  |
|   | TTBS                           | 0,15 M NaCl<br>10 mM Tris/HCl pH 7,5<br>0,01 % Tween 20   |
|   |                                |   |
|   |                                |   |
|   |                                |   |
| EMSA<br>(elektrophoretic mobility<br>shift assay) | 2 x Bindepuffer<br>(allgemein) | 50 mM Tris/HCl pH 8,0<br>12 mM MgCl <sub>2</sub><br>1 mM EDTA<br>1 mM DTT<br>20 % Glycerin  |



| Methode               | Lösung                   | Zusammensetzung   |
|-----------------------|--------------------------|---|
|                       | 2 x Bindepuffer (NFW)    | 40 mM Tris/HCl pH 7,1<br>0,4 mM EDTA<br>40 mM $\beta$ -Mercaptoethanol<br>0,4 % Triton X100<br>20 % Glycerin<br>12 mM $MgCl_2$<br>160 mM NaCl |
| <i>Footprint</i>      | 10 x Cofaktor            | 10 mM $MgCl_2$<br>5 mM $CaCl_2$   |
|                       | DNase-Stop               | 270 mM NaAc<br>45 mM EDTA<br>0,2 % SDS<br>9 $\mu$ g/100 $\mu$ l tRNA  |
|                       | DNase-Dilution           | 10mM Tris/HCl pH 7,5<br>25 mM NaCl<br>0,5 mM DTT  |
|                       | Footprint-Auftragspuffer | Formamid<br>3 % Wasser<br>0,25 % Bromphenolblau   |
| Kernproteinextraktion | Puffer C                 | 20 mM Tris/HCl pH 7,9<br>420 mM NaCl<br>1,5 mM $MgCl_2$<br>0,2 mM EDTA<br>0,5 mM DTT<br>0,2 mM PMSF<br>25 % Glycerin                          |
| MACS-System           | PBE                      | PBS* mit 0,5 % BSA und 2mM EDTA (pH 7,2)  |
| <i>Northern Blot</i>  | 20 x SSC                 | 3 M NaCl<br>0,3 M Natriumcitrat   |
|                       | 20 x MOPS                | 200 mM MPS pH 7<br>50 mM Natriumacetat<br>10 mM EDTA  |
|                       | RNS-Bioling-Mix          | 65 % Formamid<br>25 % Formaldehyd (37 %)<br>1 x MOPS  |
|                       | RNS-Gel-Ladepuffer       | 50 % Glycerin<br>1 mM EDTA<br>0,25 % Bromphenolblau<br>0,25 % Xylencyanol   |
|                       | Methylenblau—Lösung      | 0,03 % Methylenblau in<br>0,3 M NaAc pH 5,5   |

| Methode                 | Lösung                           | Zusammensetzung   |
|-------------------------|----------------------------------|---|
|                         | SSC-Hybridisierungspuffer        | 0,1 % Lauroylsarkosin<br>0,02 % SDS<br>2 g Blocking-Reagenz (Roche)<br>50 % Formamid                |
| Polyadenylierung        | Poly-A- <i>Tailing</i> -Puffer   | 400 mM Tris/HCl pH 8<br>100 mM MgCl <sub>2</sub><br>3 M NaCl und 0,5 g/ml BSA                       |
| <i>Primer Extension</i> | TEN 600                          | 10 mM Tris /HCl pH 7,4<br>5 mM EDTA<br>600 mM NaCl  |
| <i>Nuclear Run On</i>   | 100 x Denhard's Lösung           | 2 % BSA (Rinderserum Albumin)<br>2 % Ficoll<br>2 % Polyvinylpyrrolidon (PVP)                        |
|                         | SSPE-Hybridisierungspuffer       | 5 x SSPE<br>5 x Denhard's Lösung<br>50 % Formamid<br>0,5 % SDS                                      |
|                         | 20 x SSPE                        | 3,6 M NaCl<br>0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,7<br>2 mM EDTA                          |
|                         | Glycerin-Puffer                  | 50 mM Tris pH 8,3<br>5 mM MgCl <sub>2</sub><br>0,1 mM EDTA<br>40 % Glycerin                         |
|                         | NP 40-Puffer                     | 10 mM Tris pH 7,4<br>10 mM NaCl<br>3 mM MgCl <sub>2</sub><br>0,5 % NP 40                            |
|                         | <i>Run on</i> -Puffer            | 20 mM Tris pH 7,4<br>10 mM MgCl <sub>2</sub><br>0,6 M KCl<br>0,5 mM CTP<br>je 1 mM ATP, UTP, GTP    |
|                         | <i>Run on</i> –Waschpuffer I/ II | 2 x SSC      0,1 x SSC<br>0,1 % SDS    0,1 % SDS  |
| <i>RNase Protection</i> | 5 x RP- Hybridisierungs-Puffer   | 200 mM Pipes pH 6,4<br>2 M NaCl<br>5 mM EDTA  |
|                         | RNase Digestion-Puffer           | 10 mM Tris/HCl pH 7,5<br>300 mM NaCl<br>5 mM EDTA<br>0,5 U/µl RNase T <sub>1</sub> ; 4 µg/µl RNaseA |

### 2.1.2 Standard-DNS, Standard-RNS und Proteinstandard

Zur Bestimmung der Größe von DNS-Molekülen und RNS-Molekülen in Agarosegelen wurden folgende Standards benützt:

100 bp Ladder (NEB):

2000, 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, Bp

DNS-Standard VII (Boehringer Mannheim):

8576, 7427, 6106, 4899, 3639, 2799, 1953, 1882, 1515, 1482, 1164, 992, 710, 492, 359 Bp

RNS-Standard 0.2-10 kb (Sigma):

10000, 6000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 500, 200 B

Zur Bestimmung der Größe von Proteinen in SDS-Gelen wurde folgender Standard benützt:

Benchmark (Gibco BRL):

220, 130, 90, 70, 60, 40, 30, 20, 15, 10 kDa

### 2.1.3 Bakterien

Für Klonierungsarbeiten wurden die *E.coli* Stämme DH5 $\alpha$  und TOP10 verwendet. Der Stamm DH5 $\alpha$ , der sich vom Sicherheitsstamm K12 ableitet, gehört zu den gebräuchlichsten Laborstämmen und stammt ursprünglich aus der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen in Göttingen. Der Stamm TOP10 ist kein Derivat des Sicherheitsstammes K12 und wurde von der Firma Invitrogen bezogen. Dieser Stamm diente zur TOPO-TA-Klonierung von PCR-Fragmenten.

DH5 $\alpha$ :

F<sup>-</sup> end A1 *hsdR*17 (*r<sub>k</sub>-m<sub>k</sub>*<sup>+</sup>) *supE*44 *thi*recA1 *gyrA* (Nal<sup>r</sup>) *rel* A1  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 ( $\Phi$ 80 $\Delta$  *lac* $\Delta$ (*lacZ*)m15) (Woocock et al., 1989)

TOP10

F<sup>-</sup> *mcr* A  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80 *lacZ* $\Delta$ 15  $\Delta$ *lacX*74 *recA*1 *deoR* *araD*139  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *end* A1 *nupG*

## 2.1.4 Plasmide

Die nachfolgenden Plasmide wurden für Klonierungsarbeiten verwendet (siehe auch Anhang 3).

### pCR<sup>®</sup>2.1 (Invitrogen, *TA-cloning*<sup>®</sup>-Kit)

Dieses Plasmid wurde für die schnelle Klonierung von PCR-Fragmenten eingesetzt, die mit einer Taq-Polymerase oder einer Enzymmischung mit Taq-Polymerase amplifiziert wurden. Diese Polymerase besitzt die Eigenschaft, an den 3'-Enden der entstehenden PCR-Produkte ein ATP anzuhängen. Diese Überhänge werden für die Klonierung in den Vektor, der überhängende TTP-Enden trägt, genutzt. Neben dem T7-Promotor enthält das Plasmid außerdem den *lac*-Promotor, das *lacZ*- $\alpha$ -Fragment, das Gen für die  $\beta$ -Laktamase ( $\text{amp}^r$ ), eine Kanamycin-Resistenz und den ColE1- und *f1-origin*.

### pCR<sup>®</sup>II (Invitrogen, *TA-cloning*<sup>®</sup>-Kit)

Auch dieses Plasmid wurde für die schnelle Klonierung von PCR-Fragmenten eingesetzt, die mit einer Taq-Polymerase oder einer Enzymmischung mit Taq-Polymerase amplifiziert wurden. Zusätzlich zu den Eigenschaften des Vektors pCR<sup>®</sup>2.1 enthält dieses Plasmid noch den Sp6-Promotor.

### pRep9 (Invitrogen)

Mit diesem Vektor können stabile Zelllinien hergestellt werden, bei denen das Plasmid episomal an die Tochterzellen weitergegeben wird. Hierzu kodiert der Vektor für EBNA-1 und den Ori P von EBV. Desweiteren besitzt der Vektor eine Neomycin-Resistenz zur Selektion in eukaryontischen Zellen, den ColE1-*origin* zur Vermehrung und eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion in Bakterien.

### pLitmus28

Dieses Plasmid dient ursprünglich zur Mutation nach Kunkel, wurde aber in diesem Fall dazu verwendet, den Bereich der Gene EBER-1 und EBER-2 aufzunehmen. Durch die geringe Größe ist es für die Mutationen mit der *QuickChange*-Methode gut geeignet. Zur Vermehrung in Bakterien besitzt der Vektor den ColE1-*origin* und eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion.

### 2.1.5 Zelllinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C und 7 % CO<sub>2</sub> mit RPMI 1640 (mit L-Glutamin) als Suspensionskultur kultiviert. Dem Medium wurde 10 % foetales Kälberserum (FKS) und 5 % Anti-PPLO (PAA) zugesetzt. Um Kontaminationen und Resistenzbildung zu vermeiden, wurde dem Medium abwechselnd 5 % Gentamycin (10 mg/ml) und 5 % Kanamycin (10 mg/ml) zugegeben. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

#### Akata: (Takata *et al.*, 1991)

Diese Zelllinie wurde aus einem asiatischen Burkitt's Lymphom gewonnen. Diese Zelllinie ist latent infiziert und EBNA-1 wird nur vom Q-Promoter aus transkribiert (Lat I).

#### B95-8: (ATTC CRL 1612)

Diese Zelllinie wurde durch Infektion von Mamoset (Neuweltaffe)-Leukozyten mit EBV aus Rachenspülwasser eines Patienten mit infektiöser Mononukleose gewonnen. Auch diese Zellen sind latent infiziert (Lat III) und in 5-10 % der Zellen repliziert EBV lytisch.

#### DG 75: (Ben-Bassat *et al.* 1977; DMS2 No: ACC 83)

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine EBV-negative Zelllinie, die aus einem Burkitt's Lymphom gewonnen wurde.

#### P3HR1 Klon 13: ( ATCC HTB 62)

Diese latent mit EBV infizierte Burkitt's Lymphom-Zelllinie entstand bei der Passagierung der BL-Zelllinie Daudi und besitzt unter anderem eine Deletion im EBNA-2-, das für die Immortalisierung von lymphoiden Zellen entscheidend ist, und im EBNA-5 -Protein. Ferner ist in einem Teil der P3HR1 Klon 13-Viruspartikel das Genom durch Passagierungen rearrangiert, wodurch die *Bam* HI Z-Region durch Inversion unter der Kontrolle des W-Promoters für den EBNA-Leserahmen steht (*het*-DNS). Daher repliziert EBV in 1 - 5 % der Zellen spontan lytisch.

#### P3HR1 Klon 16: (Tayler *et al.* 1989)

Diese mit EBV latent infizierte Burkitt's Lymphom-Zelllinie (BL) entstand bei der Passagierung der BL-Zelllinie Daudi und besitzt unter anderem eine Deletion im EBNA-2-Protein, das für die Immortalisierung von lymphoiden Zellen entscheidend ist, und im EBNA-5 -Protein.

## 2.2 Arbeiten mit Bakterien

### 2.2.1 Klonierungen in *E.coli*

**Chemisch kompetente Bakterien (Rubidium-Chlorid-Methode).** 100 ml LB-Medium ohne Antibiotikum wurden mit 5 ml Übernachtskultur eines *E.coli* Stammes beimpft. Beim Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,6 wurden die Bakterien mit 500 x g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert und in 10 ml Lösung A resuspendiert. Im folgenden wurde stets zügig und auf Eis gearbeitet. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien vorsichtig in 20 ml auf Eis vorgekühlte Lösung B aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Nach wiederholter Zentrifugation wurden die Bakterien in 5 ml Lösung B resuspendiert und mit 575 µl sterilem Glycerin (Endkonzentration 10 %) versetzt. Die Suspension aus kompetenten Bakterien wurde in 200 µl-Portionen in vorgekühlte Reaktionsgefäße transferiert und bis zur Transformation bei –70 °C eingelagert.

**TA-Cloning.** Das Prinzip dieses Systems beruht darauf, daß während der PCR von der Polymerase an den 3'-Enden der Amplifikationsprodukte ein ATP angefügt wird. Der TA-Vektor besitzt offene TTP-Enden, so dass eine Ligation zwischen Vektor und PCR-Produkt unabhängig von jeglichen Schnittstellen erfolgen kann. Ligation und Transformation in geeignete Bakterien wurden nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) durchgeführt. Positive Klone wurden mittels der alkalischen Schnelllyse identifiziert und u.a. zur *in vitro* Transkription verwendet (siehe Kapitel 2.4.5).

**Präparative Spaltung von Plasmiden und PCR-Produkten für Klonierungen.** Für Klonierungen wurden Vektor und *Insert*-DNS jeweils einer präparativen Spaltung unterzogen. Dazu wurden 10 µg DNS (jeweils Vektor und *Insert*) oder das PCR-Produkt in einem Volumen von 40 µl verdaut. Die dafür verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden entsprechend den Klonierungsschemata ausgewählt.

**Dephosphorylierung von DNS.** Um Selbstligation eines durch Restriktionsendonukleasen linearisierten Vektors zu verhindern, wurden für die Klonierung die DNS-Enden dephosphoryliert. 500 ng DNS wurden mit 5 µl 10 x Phosphatase-Puffer und 5 *Units Calf Intestinal* Phosphatase in 50 µl Endvolumen gemischt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym 20 min bei 65 °C inaktiviert.

**Isolierung von DNS aus Agarosegelen.** Die gewünschte Bande wurde aus dem TAE-Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick PCR-PURIFICATION-KIT (Quiagen)

nach dem Protokoll des Herstellers gereinigt. Hierbei bindet die DNS an eine Matrix und kann durch Änderung des pH-Wertes eluiert werden.

**Ligation von DNS.** Isolierte Vektor- und *Insert*-DNS wurden in einem molaren Verhältnis von 1:5 bis 1:10 in die Ligation eingesetzt. Der 20 µl-Standard-Ligationsansatz enthielt neben der *Insert*-DNS 100 ng Vektor-DNS, 2 µl des 10 x T4-Ligase-Puffers und 1 µl T4-DNS-Ligase (2000 U/µl, NEB). Die Ligation erfolgte 1 h bei RT.

**Transformation in Bakterien.** 200 µl kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit 20 µl Ligationsansatz gemischt und für 45 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 2 min bei 42 °C und sofortige Abkühlung auf Eis. Zu diesem Ansatz wurde 1 ml LB<sub>0</sub>-Medium zugegeben und die transformierten Bakterien zur Expression des entsprechenden Resistenzgens für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Je 50 µl, 200 µl und der zentrifugierte Rest der Suspension wurden auf LB<sub>Amp</sub>-Platten ausgestrichen und über Nacht in einem Brutschrank bei 37 °C belassen. Am folgenden Tag konnten Klone zur genaueren Charakterisierung in 3 ml LB<sub>Amp</sub> angeimpft und Plasmid-DNS mittels alkalischer Lyse präpariert werden.

Nach Charakterisierung der isolierten DNS durch Restriktionsspaltung wurden alle neuen Plasmidkonstrukte mit geeigneten Oligonukleotiden in den wichtigen Bereichen sequenziert (siehe Kapitel 2.2.2).

## 2.2.2 Sequenzierung von DNS

Die verwendete Sequenziermethode des *Taq-Cycle Sequencing* entspricht dem Prinzip der Kettenabbruchmethode nach *Sanger*. Im Unterschied zu dieser Methode wird hier diese Reaktion durch eine PCR mit der thermostabilen Taq-Polymerase ersetzt. Im Verlauf der PCR akzeptiert die Taq-Polymerase fremde Substrate, sogenannte *Dye-Terminatoren* (mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte ddNTPs), die zusätzlich zu den Desoxyribonukleotiden verwendet werden. Der Einbau der *Dye-Terminatoren* in den frisch synthetisierten DNS-Strang bewirkt, den Abbruch der Synthese. Bei dem verwendeten Gerät befanden sich alle vier Terminatoren in einem einzigen Ansatz, welcher nur eine Spur auf einem Sequenzgel beansprucht.

## **2.3 Arbeiten mit Zellen**

### **2.3.1 Induktion des lytischen Zyklus von EBV**

24 Stunden vor der Induktion der lytischen Replikation wurden die Zellen auf eine Dichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml mit frischem Medium verdünnt. Dadurch wurde gewährleistet, daß sich die Zellen bei der Induktion in der logarithmischen Vermehrungsphase befanden. Zur Überführung in den lytischen Zyklus wurden die Zellen 24 bis 72 Stunden mit 40 ng/ml TPA, 3 mM Buttersäure, 50 µl/ml aktivierten TGF-β (1:10 Vol. 0,2 M NaOH, schütteln; 1:10 Vol. 0,2 M HCL, schütteln) versetzt <sup>4</sup>.

### **2.3.2 Kernexporthemmung mit Leptomycin B (LMB)**

Die Zellen wurden für 24 Stunden mit 5 nM LMB (Endkonzentration) versetzt.

### **2.3.3 Transfektion eukaryontischer Zellen mittels Elektroporation**

Die Elektroporation wurde zum Einbringen von DNS in eukaryontische Zellen verwendet. Hierzu wurden am Vortag die Zellen auf eine Dichte von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml mit frischem Medium verdünnt. Pro Elektroporation wurden  $1 \times 10^7$  Zellen bei 950 x g abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und in 400 µl PBS aufgenommen. Je 40 µg der entsprechenden Plasmide wurden auf 100 µl mit PBS verdünnt, in Elektroporationsküvetten vorgelegt, mit den Zellen vermenget und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Elektroporation mit Doppelpuls (1. Puls: U = 500-700 V, K = 25 C, R = 99 Ω; 2. Puls; U = 150 V, K = 1500 C, R = 99 Ω) wurden die Zellen in 6 ml Medium überführt und bis zur weiteren Untersuchung 48 Stunden kultiviert.

### **2.3.4 Das MACS-Separationssystem**

Dieses System beruht auf den unterschiedlichen Fliesgeschwindigkeiten von Partikeln mit und ohne magnetische Eigenschaften im Magnetfeld.



#### 2.3.4.1 Abtrennung der Zellen mit lytisch replizierendem EBV

$1 \times 10^8$  Zellen wurden mit einer Tischzentrifuge (Hettich) mit  $350 \times g$  für 10 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert, zweimal mit PBE gewaschen und in 20 ml PBE resuspendiert. Nach Zugabe von 40  $\mu$ l gp350/220-Antikörper (mab-64D7: Ammoniumsulfat-Fällung des Überstands von gp350/220-Antikörper-produzierenden Hybridomazellen) zur Markierung der Zellen mit lytisch-replizierendem EBV wurde die Probe für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, zweimal mit PBE gewaschen und in 800  $\mu$ l PBE resuspendiert. Es folgte eine Inkubation mit 200  $\mu$ l eines Sekundärantikörpers (Ziege-Anti-Maus-IgG, Miltenyi Biotec), der an paramagnetische Partikel gekoppelt war, für 15 min bei Raumtemperatur. Um eine spätere Analyse der Reinheit der Zellen durchführen zu können, wurde mit 200  $\mu$ l eines FITC-gekoppelten Antikörpers (Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper FITC-gekoppelt, DAKO) 10 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß inkubiert.

Nach einmaligem Waschen mit PBE wurden die Zellen auf eine RS<sup>+</sup>-Säule (Miltenyi Biotec), die vorher mit PBE äquilibriert wurde, aufgetragen. Diese Säule war von einem starken Magnetfeld umgeben, so daß die markierten Zellen zurückgehalten wurden. Nachdem die Zellen 3 x mit 500  $\mu$ l PBE gewaschen wurden, wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die zurückgehaltenen Zellen mit 1ml PBE ausgespült.

#### 2.3.4.2 Abtrennung H2K<sup>K</sup>-transfizierter Zellen

Eine Anreicherung transfizierter Zellen erfolgte über transient exprimiertes Maus-MHC K<sup>k</sup>, das auf den transfizierten Plasmiden zusätzlich kodiert wurde. Die toten Zellen, die durch die Elektroporation in großem Umfang vorhanden waren, wurden über ein *Ficoll*-Kissen ( $d = 1,077$  g/ml) geschichtet und 30 min bei  $350 \times g$  bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die lebenden Zellen, ca.  $5 \times 10^7$ , sammelten sich in einem Ring überhalb des *Ficoll*, wurden abgesaugt, zweimal mit 50 ml PBS\* gewaschen und in 320  $\mu$ l PBE/ $1 \times 10^7$  Zellen resuspendiert. Nach Zugabe von 80  $\mu$ l MACSselect K<sup>k</sup> *Microbeads* (Miltenyi Biotec)/  $1 \times 10^7$  Zellen zum markieren der Zellen, wurde die Probe für 15 min bei 10 °C (Kühlschrank) inkubiert, mit einer Tischzentrifuge (Hettich) mit  $200 \times g$  für 10 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert und in 1000  $\mu$ l PBE resuspendiert. Die Zellen wurden nun auf eine *Large Cell*-Säule (Miltenyi Biotec), die vorher mit 500  $\mu$ l PBE äquilibriert wurde, aufgetragen. Diese Säule war von einem starken Magnetfeld umgeben, so daß

die markierten Zellen zurückgehalten wurden. Nach drei Waschgängen mit je 500 µl PBE, wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die Zellen mit 2 ml Medium ausgespült. Analysen mit dem FACScalibur (Bekton Dickinson) erfolgten bei einer kleinen Probe der Zellen sowohl vor der Trennung als auch bei der Positivfraktion.

#### **2.3.4.3 Fischen von EBER-1/2-RNA aus Gesamt-RNS**

Zur Aufreinigung von EBER-1/2-RNS aus Gesamt-RNS wurden  $1 \times 10^7$  latent infizierte bzw. lytisch infizierte Zellen in 1 ml *Lysis-Binding-Buffer* (Miltenyi Biotec) lysiert und mit 120 pmol biotiniliertem EBER-1/2-Oligo (siehe Tab. 2.4.6.4), welches für 5 min bei 95 °C aufgeköcht und auf Eis wieder abgekühlt wurde, versetzt. Die Bindung der Oligos an die zu fischende RNS erfolgte 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 40 µl MAGmol Streptavidin-*Microbeads* zugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auftrennung erfolgte wiederum in einem starken Magnetfeld. Die Proben wurden auf die mit 100 µl *Lysis-Binding-Buffer* äquilibrierten µ-Säulen aufgetragen, 2 x mit 200 µl *Lysis-Binding-Buffer* und 2 x mit 200 µl *Wash-Buffer* (Miltenyi Biotec) gewaschen. Zur Elution im Magnetfeld wurden 150 µl 80 °C warmes DEPC-Wasser verwendet. Das Volumen wurde anschließend auf 5 µl eingengt und die so gewonnene EBER-1/2-RNS in den 3'-*RACE-Assay* eingesetzt.

#### **2.3.5 Fluoreszenzanalysen mit Hilfe der Durchflußzytometrie**

$5 \times 10^5$  Zellen wurden mit einer Tischzentrifuge (Hettich) bei 950 x g abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und in 500 µl PBS aufgenommen. Da die zu untersuchenden Zellen mit einem Fluoreszenzprotein (eGFP) transfiziert waren, war kein Nachfärben nötig. Die Zellen wurden sofort zur Analyse im Durchflußzytometer (FACScalibur, Bekton Dickinson) verwendet.

#### **2.3.6 Nuclear Run On -Experimente**

Kernpräparation. Pro Ansatz wurden  $1 \times 10^7$  Zellen in einer Hettich Tischzentrifuge mit 950 x g bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS

gewaschen, der Niederschlag in 1 ml NP40-Puffer resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren mit 350 x g in einer Kontron Kühlzentrifuge für 2 min wurden die Kerne mit 2 ml NP40-Puffer gewaschen, in 100 Öl Glycerin-Puffer aufgenommen und in flüssigem Stickstoff weggefroren.

*Run on.* Zur Synthese der radioaktiv-markierten RNS wurden 100 Öl Kerne mit 50 Öl *Run on*-Puffer und 125  Ci  $\alpha$ -P<sup>32</sup>-CTP (~ 400Ci/mmol) zusammengegeben und der Ansatz mit Wasser auf 200 Öl aufgefüllt. Anschließend wurde unter mehrmaligem Drehen der Reaktionsgefäße bei 30  C für 30 min inkubiert. Mit RNase-freier DNase (Ambion) wurde bei einer Endkonzentration von 20  g/ml für 5 min bei 30  C die Reaktion gestoppt. Nach Einstellung der SDS-Konzentration auf 1 % wurde bei 37  C für 30 min mit Proteinase K (200 ng/ml) verdaut. Anschließend wurden nach einmaligem Ausschütteln mit Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25/24/1) (PCI) die nicht eingebauten Nukleotide durch F llung abgetrennt. Dazu wurde dem Ansatz 1 Öl Glykogen (Roche) und Ammoniumacetat bis zu einer Konzentration von 2,3 M zugegeben und mit einem Volumen Isopropanol für eine Stunde bei -80 C gef llt. Die RNS wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, lyophilisiert und in 100 Öl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen.

Hybridisierung der *Run on*-RNS. Die Membran (PALL, Biotex plus) auf der die *in vitro* transkribierten Anti-Sense-RNS Sonden (siehe Kapitel 2.4.4) immobilisiert wurden (siehe Kapitel 2.4.2), wurde für zwei Stunden bei 68  C mit Hybridisierungspuffer geblockt. Die aus dem *Run On*-Experiment erhaltene RNS wurde danach zugegeben und über Nacht bei 72  C hybridisiert. Anschließend wurde zweimal mit Waschpuffer I bei Raumtemperatur und zweimal mit Waschpuffer II bei 60  C gewaschen. Die Signale auf der Membran wurden mit Hilfe der Autoradiographie sichtbar gemacht. Dazu wurde die Membran 3 Tage in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie bei -80  C auf einen X-omat Röntgenfilm (Kodak) aufgelegt und danach in einem vollautomatischen Filmentwickler (Agfa) entwickelt.

### 2.3.7 Präparation von Proteinextrakten aus eukaryontischen Zellkernen

1 x 10<sup>8</sup> Zellen wurden mit 800 x g 10 min bei 4  C zentrifugiert und zweimal mit 10 ml PBS gewaschen. Zur Präparation der Zellkerne wurden die Zellen in 10 ml NP40-Puffer resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren mit 350 x g in einer Kontron

Kühlzentrifuge für 2 min wurden die Kerne mit 10 ml NP40-Puffer gewaschen, in 500 µl Puffer C aufgenommen und 30 min im Kühlraum unter ständiger Bewegung inkubiert. Die Kernreste wurden bei 4°C 30 min mit 22700 x g abzentrifugiert und der Überstand in 100 µl *Aliquots* in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Kernextrakte (KE) wurden bei –80 °C gelagert. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bestimmung der optischen Dichten in einem Photometer (UVICON 930, Kontron Instruments) mit der Formel:

$$\text{Konzentration} = \text{Verdünnungsfaktor} \times [(187 \times \text{OD}_{230}) - (81,7 \times \text{OD}_{260})]$$

### 2.3.8 FISH (*Fluorescent in-situ Hybridisation*) zum Nachweis der EBER-1/2-RNS

**Silanisierung der Objektträger.** Die Objektträger (OT) wurden mit Isopropanol geputzt und eine Stunde bei Raumtemperatur in Silanol (10 % Silikon in Isopropanol, Serva) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Wasser für 10 min bei Raumtemperatur wurden die Objektträger über Nacht bei 60 °C getrocknet.

**Fixierung der Zellen.** Pro Ansatz wurden  $3 \times 10^5$  Zellen in einer Hettich Tischzentrifuge mit 350 x g bei Raumtemperatur abzentrifugiert, in 50 µl PBS aufgenommen und mit 350 x g 4 min bei Raumtemperatur mit einer *Cytospin*-Zentrifuge (Cytospin 3, Shandon) auf die Objektträger aufgebracht. Nach der Fixierung für 45 min bei Raumtemperatur mit 4 % Paraformaldehyd in PBS, wurden die OT 20 min bei Raumtemperatur mit 0,2 N HCl und 15 min bei 37 °C mit Proteinase K (5 µg/ml in 50 mM Tris/HCl pH 8) inkubiert. Einer Refixierung für zwei min bei Raumtemperatur mit 4 % Paraformaldehyd folgte die schrittweise Dehydrierung mit 50, 70, 95 und 100 %-igem Ethanol. Eine Lagerung der OT konnte im 70 % Ethanol-Schritt erfolgen.

**Hybridisierung der Sonden.** Die DIG-markierten Oligonukleotide (siehe Kapitel 2.4.6 und 2.4.5.4) zur Detektion von EBER-1/2 wurden in *FISH*-Hybridisierungs-Lösung auf 2 ng/µl verdünnt, 5 min bei 80 °C denaturiert, auf Eis gekühlt. Je Objektträgerfeld wurden 10 µl aufgetragen und mit einem Deckgläschen versehen. Die Hybridisierung erfolgte für zwei Stunden bei 50 °C in einer feuchten Kammer. Nachfolgend wurde mit der Nachhybridisierungslösung für 45 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert, 30 min mit RNase (50 mg/ml RNase A in Nachhybridisierungslösung) bei Raumtemperatur verdaut und viermal mit 500 µl TTBS bei Raumtemperatur gewaschen.

**Nachweis der EBER-Transkripte.** Die Objektträger mit den an die EBER-Transkripte hybridisierten, Digoxigenin-markierten Oligonukleotide wurden 30 min bei 4 °C mit 1,5 % *Blocking*-Reagenz in TBS inkubiert. Der Nachweis des Digoxigenin erfolgte durch Bindung mehrerer Anikörper. Die Bindung der Antikörper erfolgte jeweils 30 min bei Raumtemperatur, gefolgt von drei Waschschritten für 5 min mit TTBS. Als erstes wurde ein Anti-DIG-Antikörper (Roche, Anti-Digoxigenin-Maus-mab, 1 333 062) 1:250 in TBS inkubiert. Es folgten ein Kaninchen-Anti-Maus-AK FITC-gekoppelt (DAKO, F0261) 1:50 in TBS und ein Schwein-Anti-Kaninchen-AK FITC-gekoppelt (DAKO, F0205) 1:50 in TBS. Mit diesem letzten Antikörper zusammen wurde die DNS in den Zellkernen mit DAPI (Roche, 236 276) 1:10000 in TBS gefärbt. Nach Entwässern der Zellen auf den OT mit 50, 70, 95 und 100 %-igem Ethanol und Trocknung wurden die Zellen auf den OT mit Glow (EnerGene, M001 0010) über Nacht eingebettet und an einem Fluoreszenz-Mikroskop (MCRX, Leica) mit der *Meta-View-Software* ausgewertet.

### 2.3.9 RNS- Präparation

**Tri-Reagenz-Protokoll.**  $1 \times 10^7$  Zellen wurden in einer Tischzentrifuge (Hettich) mit 950 x g 10 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 1 ml Tri-Reagenz (Sigma) resuspendiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 200 µl Chloroform versetzt. Nach Inkubation der Suspension für 5 min bei Raumtemperatur, wurde diese 15 min bei 4°C mit 22700 x g abzentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Isopropanol versetzt. Nach dem Fällern der RNS für 10 min auf Eis wurde 10 min bei 4°C mit 22700 x g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit 1 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen und in 50 µl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen.

### 2.3.10 DNS-Präparation

Die DNS-Präparation erfolgte aus den Zelllinien Akata, B95-8, Raji, P3HR1-13 und P3HR1-16 mit einem *Cell Culture and Blood Kit* (Qiagen) nach beiliegendem Protokoll.

## 2.4 Zellfreie Arbeiten

### 2.4.1 Elektrophorese von Nucleinsäuren

**Agarosegele.** Zur Analyse von mittels Restriktionsendonukleasen gespaltener DNS, zur Isolierung von DNS-Fragmenten und für die Überprüfung von PCR-Proben wurde die DNS in einer waagerechten Gelapparatur (Hölzel) in einem Agarosegel von 5-10 mm Dicke und einer Laufstrecke von 10-15 cm mit einer Spannung von 7 V/cm bei konstanter Stromstärke aufgetrennt. Die Agarose wurde hierzu in 1 x TAE-Puffer suspendiert und in der Mikrowelle aufgekocht. Die noch warme Lösung wurde mit 1/1000 Volumen Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) versetzt und in die Gelkammer gegossen. Als Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer.

**Denaturierende Agarosegele.** Die Auftrennung der in Abschnitt 2.3.8 präparierten RNS erfolgte in denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen nach einer Methode von Sambrook <sup>69</sup>. Zu 1-10 µg in DEPC-Wasser gelöster RNS wurde das doppelte Volumen RNS-*Boiling-Mix* gegeben. Die Probe wurde 5 min bei 65 °C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mit 2 µl RNS-Gel-Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte in einer Horizontal-Gelelektrophorese-Apparatur (Hölzel) mit einer Laufstrecke von 20 cm (320 ml Gelvolumen). Dazu wurden 234 ml DEPC-behandeltes Wasser und 32 ml 10 x MOPS-Puffer mit 4,8 g Ultrapur-Agarose (Gibco/BRL) in der Mikrowelle aufgekocht und 30 min auf 60 °C abgekühlt. Anschließend wurden 54 ml Formaldehyd zugegeben und das Gel zügig gegossen. Der Gellauf wurde in 1x MOPS-Puffer bei 10 V/cm durchgeführt. Als Größenstandard dienten definierte RNS-Fragmente der Firma Sigma.

**Polyacrylamid-Gele.** Die genaue Auftrennung von DNS-Fragmenten erfolgte für unterschiedliche Methoden in (denaturierenden) Polyacrylamid-Gelen. Die Zusammensetzungen können der Tabelle 2.4.3 entnommen werden.

Tabelle 2.4.3: Polyacrylamidgele

|                                 | <b>Footprint</b> |       | <b>Primer Extension</b> |        | <b>RNase Protection</b> |        | <b>EMSA</b> |       |
|---------------------------------|------------------|-------|-------------------------|--------|-------------------------|--------|-------------|-------|
| <b>Protogel (30 %; 37,5 :1)</b> | -----            |       | -----                   |        | -----                   |        | 5%          | 10 ml |
| <b>Accugel (40 % ; 19 :1)</b>   | 8 %              | 20 ml | 9 %                     | 5,6 ml | 12,5 %                  | 7,9 ml | -----       |       |
| <b>Harnstoff</b>                | 8 M              | 57 g  | 8 M                     | 10,5 g | 8 M                     | 10,5 g | -----       |       |
| <b>10 x TBE</b>                 | 1 x TBE          | 12 ml | 0,6 x TBE               | 1,5 ml | 1 x TBE                 | 2,5 ml | 1 x TBE     | 6 ml  |
| <b>Wasser</b>                   | 40 ml            |       | 12,5 ml                 |        | 10 ml                   |        | 41 ml       |       |
| <b>TEMED</b>                    | 50 µl            |       | 50 µl                   |        | 50 µl                   |        | 100 µl      |       |
| <b>APS (10 %)</b>               | 500 µl           |       | 250 µl                  |        | 250 µl                  |        | 500 µl      |       |
| <b>Gesamtvolumen</b>            | 120 ml           |       | 25 ml                   |        | 25 ml                   |        | 60 ml       |       |

## 2.4.2 Northern Blot-Analysen

*Northern Blot.* Die in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennten RNS-Proben oder *in vitro* transkribierten Sonden wurden mit Hilfe der Saugblottechnik auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Biodyne plus, Pall) übertragen. Das Gel wurde dazu 3 x 20 min in DEPC-behandeltem Wasser bei Raumtemperatur zur Entfernung des Formaldehyds geschwenkt, 20 min in 0,005 N NaOH, 20 min in DEPC-Wasser und 30 min in 20 x SSC-Puffer -mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt- inkubiert. Das Gel wurde daraufhin mit der Oberseite nach unten auf eine in einer Schale liegende, erhöhte Plattform, auf der überhängendes Whatmann-Papier (Schleicher und Schüll) geschichtet war, gelegt. Die Nylon-Membran wurde in gleicher Größe wie das Gel ausgeschnitten und unter Vermeidung von Blasenbildung auf das Gel gelegt (<sup>69</sup>. Unter Zuhilfenahme mehrerer Schichten Whatmann- und Filterpapier, sowie durch Beschwerung des Blotaufbaus, wurde die RNS über Nacht durch die Kapillarkräfte mit 20 x SSC-Puffer auf die Membran transferiert. Die RNS wurde am folgenden Tag durch UV-Quervernetzung -autocrosslink- (*Stratalinker*, Stratagene) auf der Nylonmembran fixiert und mittels Methylenblaufärbung (0,05 % Methylenblau in 0,3 M NaAc pH 5,5) sichtbar gemacht.

Hybridisierung von Northern-Blots. Zur Sondenhybridisierung wurde die Membran für zwei Stunden in 5-10 ml SSPE-Hybridisierungslösung zum Absättigen der freien Bindungsstellen bei 68 °C prähybridisiert. 5 µl der markierten Sonde ( siehe 2.4.4) wurden 5 min bei 95 °C in 500 µl Hybridisierungslösung denaturiert, auf Eis gekühlt und zur Prähybridisierungslösung zugegeben.

Die Hybridisierung erfolgte bei 68 °C über Nacht. Am folgenden Tag wurde die Membran zweimal 15 min bei Raumtemperatur in *Run on*-Waschpuffer I und zweimal 15 min bei 60 °C in *Run on*-Waschpuffer II gewaschen. Zur Detektion der RNS folgte der DIG-Nachweis.

### 2.4.3 DIG-Nachweis

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen des anti-DIG-Antikörpers wurde die Membran (siehe Kapitel 2.4.3) eine Stunde in DIG-Puffer-1 mit 1 x *Blocking*-Lösung vorinkubiert. Das anti-DIG-AP-Konjugat wurde 1:5000 in diesem Puffer verdünnt. Die spezifische Bindung an die DIG-markierte Sonde erfolgte 30 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken.

Nachfolgend wurde die Membran zweimal für 15 min mit DIG-Puffer-2 gewaschen und 5 min in DIG-Puffer-3 inkubiert, um auf einen für die alkalische Phosphatase geeigneten pH-Wert von 9,5 zu äquilibrieren. Die Membran wurde danach für 5 min in 50 ml des 1:100 in DIG-Puffer-3 verdünnten AP-Substrats CSPD (Perkin Elmer) eingelegt und in eine Folie eingeschweißt. Es erfolgte eine 20-minütige Aktivierung der alkalische Phosphatase bei 37 °C. Die Lichtemission des gespaltenen Substrats konnte durch Auflegen eines BIO-MAX Röntgenfilms (Kodak) für 5-30 min nachgewiesen werden. Der Film wurde in einem vollautomatischen Filmentwickler (Agfa) entwickelt.

### 2.4.4 *in vitro* Transkription (IVT)

Bei der *in vitro* Transkription (IVT) wird aus ds-DNS mit einer DNS-abhängigen RNS-Polymerase (T7 oder Sp6) ein RNS-Transkript hergestellt. Die zu transkribierende DNS-Sequenz wird hinter einen T7/Sp6 -Transkriptionsstart in einen entsprechenden Vektor (pCR II, Invitrogen) kloniert. Durch Spalten der DNS am 3'-Ende der gewünschten, einklonierten Sequenz wird eine *run off*-Transkription ermöglicht, die RNS mit einer definierten Länge und Sequenz erzeugt.



Die Transkription großer Mengen RNS erfolgte in dem Ansatz (*Ribomax*-Ansatz):

|          | Ausgangskonzentration   | Endkonzentration |
|----------|---|------------------|
| 4 µl     | rNTP's (je 25 mM)   | je 5 mM          |
| 4 µl     | 5 x Puffer (mitgeliefert)   | 1 x Puffer       |
| 2 µl     | T7/Sp6-Enzym-Mix (300U/µl RNS Polymerase, 15 U/µl RNasin <sup>®</sup> , 190 U / ml Yeast inorganic Pyrophosphatase) | 1 U/µl           |
| 1 µg     | linearisierte DNS   |                  |
| ad 20 µl | DEPC-H <sub>2</sub> O   |                  |

Die Transkription erfolgte drei Stunden bei 37 °C. Nach Zugabe von 1 µl DNase RQ1 (1 U / µl) und anschließendem Verdau der DNS für 1 Stunde bei 37 °C wurde der Ansatz auf 100 µl mit DEPC-Wasser verdünnt. Die RNS wurde durch zweimaliges Ausschütteln mit einem Volumen PCI und einmaliges Ausschütteln mit einem Volumen Chloroform gereinigt und die organischen Phasen mit 100 µl DEPC-H<sub>2</sub>O rückextrahiert. In den vereinigten wässrigen Phasen wurde die RNS mit 1/10 Volumen 3 M NaAc pH 5,5 und dem 2,5-fachen Volumen 100 %-igem Ethanol für eine Stunde bei –80 °C gefällt und 30 min bei 4 °C mit 22700 x g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde einmal mit 500 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen, nochmals 30 min bei 4 °C mit 22700 x g zentrifugiert, getrocknet und in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Zur Lagerung bei –80 °C wurde ein Volumen 100 %-iger Ethanol zugegeben.

Die Transkription DIG-/ radioaktiv-markierter RNS erfolgte mit den Ansätzen (*Riboprobe*-Ansatz):

#### *Riboprobe*- DIG-Ansatz

|          | Ausgangskonzentration                                     | Endkonzentration |
|----------|---|------------------|
| 8 µl     | rNTP's (je 2,5 mM)<br>inkl. 0,8 mM DIG-UTP und 1,7 mM UTP | je 0,5 mM        |
| 4 µl     | 5 x Puffer (mitgeliefert)                                 | 1 x Puffer       |
| 2 µl     | DTT (100 mM)  | 10 mM            |
| 0,5 µl   | RNasin <sup>®</sup> (40 U / µl)                           | 20 U             |
| 1µl      | T7/Sp6-Enzym (20U)  | 1 U/µl           |
| 1 µg     | linearisierte DNS   |                  |
| ad 20 µl | DEPC-H <sub>2</sub> O                                     |                  |

*Riboprobe*- radioaktiv-Ansatz

|          | Ausgangskonzentration                          | Endkonzentration |
|----------|--|------------------|
| je 1 µl  | GTP, ATP, UTP (je 10mM)                        | je 0,5 mM        |
| 1 µl     | CTP (1 mM)                                     | 50 µM            |
| 4 µl     | 5 x Puffer (mitgeliefert)                      | 1 x Puffer       |
| 2 µl     | DTT (100 mM)                                   | 10 mM            |
| 0,5 µl   | RNasin <sup>®</sup> (40 U/µl)                  | 20 U             |
| 1µl      | T7/Sp6-Enzym (20U)                             | 1 U/µl           |
| 5 µl     | $\alpha$ -P <sup>32</sup> -CTP (~ 400 Ci/mmol) |                  |
| 1 µg     | linearisierte DNS                              |                  |
| ad 20 µl | DEPC-H <sub>2</sub> O                          |                  |

Die Transkription erfolgte zwei Stunden bei 37 °C. Nach Zugabe von 1 µl DNase RQ1 und anschließendem Verdau der DNS für 1 Stunde bei 37 °C wurde die markierte RNS unter Zugabe von 0,1 Volumen LiCl (1M) (DIG) oder 0,5 Volumen NH<sub>4</sub>Ac (7,5 M) (radioaktiv) und dem 2,5-fachen Volumen 100 %-igem Ethanol über Nacht bei –20 °C gefällt. Nach Zentrifugation bei 4 °C mit 22700 x g wurde der Niederschlag mit 200 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

## 2.4.5 Verwendete Oligonukleotide

### 2.4.5.1 Oligonukleotide für DNS-PCR aus genomischer DNS

Die Oligonukleotide, die zur Herstellung von genomischen DNS-Fragmenten aus dem B95-8 Stamm mittels PCR benützt wurden, sind der Tabelle 2.4.6.1 zu entnehmen (siehe Abschnitt 2.4.9.1):

**Tabelle 2.4.6.1:** Oligonukleotide für DNS-PCR aus genomischer DNS

| DNS-Fragment       | Oligo-nukleotid         | Genom Koordinaten (B95-8) | Produktlänge (Bp) | Annealing-temperatur | Oligonukleotidesequenz<br>5' 3'           |
|--------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------|----------------------|---|
| <b>EBER-Genom</b>  | Ebergenom + 5'          | 6202                      |                   | 65 °C                | GAA GGA CTA GTA AGG<br>CAG GCG GGG CCT AG |
|                    | Ebergenom 3'            | 7312                      | 1110              |                      | GGA GGT TTA AAA AAG<br>CTT GGA ATT GGT GG |
| <b>EBER-1</b>      | EBER 1 5' <sup>83</sup> | 6629 - 6648               |                   | 55 °C                | AGG ACC TAC GCT GCC<br>CTA GA             |
|                    | EBER 1 3' <sup>83</sup> | 6795 - 6776               | 167               |                      | AAA ACA TGC GGA CCA<br>CCA GC             |
| <b>EBER-2</b>      | EBER 2 5' <sup>83</sup> | 6956-6975                 |                   | 55 °C                | AGG ACA GCC GTT GCC<br>CTA GT             |
|                    | EBER 2 3' <sup>83</sup> | 7104-7123                 | 172               |                      | TAG CGG ACA AGC CGA<br>ATA CC             |
| <b>gβ-Aktin</b>    | gAktin 5'               | -----                     |                   | 55 °C                | GCT ATT CTC GCA GCT<br>CAC C              |
|                    | gAktin 3'               | -----                     | 1935              |                      | GTC ATA GTC CGC CTA<br>GAA GC             |
| <b>gtRNS-Serin</b> | tRNA Ser 5'             | -----                     |                   | 49 °C                | CAC CAA ATA AGT TTC<br>TGA TGC            |
|                    | tRNA Ser 3'             | -----                     | 381               |                      | GCA CTC ACA ACT TTC<br>TAT CC             |

### 2.4.5.2 Oligonukleotide zur Amplifikation Plasmid-kodierter Sequenzen

Die Oligonukleotide, die zur Amplifikation Plasmid-kodierter Sequenzen mittels PCR verwendet wurden, sind der Tabelle 2.4.6.2 zu entnehmen (siehe Abschnitt 2.4.9.1):

**Tabelle 2.4.6.2:** Oligonukleotide zur Amplifikation Plasmid-kodierter Sequenzen mittels PCR

| DNS-Fragment           | Oligo-nukleotid     | Plasmid                             | Produkt-länge (Bp) | Annealing-temperatur | Oligonukleotidesequenz<br>5' 3'           |
|------------------------|---------------------|-------------------------------------|--------------------|----------------------|---|
| <b>H2K<sup>k</sup></b> | H2K <sup>k</sup> 5' | pMACS II K <sup>k</sup>             | 971                | 53 °C                | CAC AGC CTC GCG AGC TTA<br>TCG GCC C      |
|                        | H2K <sup>k</sup> 3' |                                     |                    |                      | ATT GGA TCT CGC GAG AAA<br>TGT TCT GGC    |
| <b>Insert EBER-1</b>   | IVSeapE1 5'         | pCMV-SEAP                           | 105                | 52 °C                | CCA TTG GCT TGA GTG AAT<br>TCG CCC G      |
|                        | IVSeapE1 3'         |                                     |                    |                      | CCA CTG ACT TCC CTG AAT<br>TCT TGG        |
| <b>Insert EBER-2</b>   | IVSeapE2 5'         | pCMV-SEAP                           | 117                | 52 °C                | GCC GCC AAG AAG CTG GAT<br>CCT GC         |
|                        | IVSeapE2 3'         |                                     |                    |                      | CCT TTT AGG ATC CTG GCA<br>GC             |
| <b>LTR 2</b>           | LTR2 * 5'           | pLit EG plus<br>pLit EGR(S)<br>plus | 1096               | 60 °C                | GTA AGT CTA GAG GGG CCT<br>AGC AAT GTC AC |
|                        | LTR2 3'             |                                     |                    |                      | TAT CTG CGG CCG CTG ACG<br>TCA CCA TGG G  |

### 2.4.5.3 Oligonukleotide für Quick Change-Mutationen

Die Oligonukleotide, die für Quick Change-Mutationen mittels PCR verwendet wurden, sind der Tabelle 2.4.6.3 zu entnehmen (siehe Abschnitt 2.4.9.3):

**Tabelle 2.4.6.3:** Oligonukleotide für Quick Change-Mutationen mittels PCR

| Oligonukleotid         | Genom Koordinaten (B95-8) | Mutation                | Oligonukleotidesequenz<br>5' 3'         |
|------------------------|---------------------------|-------------------------|---|
| <b>ATF A-G for</b>     | 6895                      | B95-8: A zu<br>P3HR1: G | CCT ACA ACC GTG ACG TGG CTG TTT ACC AGC |
| <b>ATF A-G rev</b>     | 6925                      |                         | GCT GGT AAA CAG CCA CGT CAC GGT TGT AGG |
| <b>Eco-Eber-1 forw</b> | 6704                      | Eco R I in<br>Eber-1    | CCC GGG TGG TGA ATT CGG TGT CTG TGG     |
| <b>Eco-Eber-1 rev</b>  | 6731                      |                         | CCA CAG ACA CCG AAT TCA CCA CCC GGG     |
| <b>Bam-Eber-2 forw</b> | 7168                      | Bam H I in<br>Eber-2    | CCC GGG GGA GGA TCC GAG AGG CTT CCC GCC |
| <b>Bam-Eber-2 rev</b>  | 7198                      |                         | GGC GGG AAG CCT CTC GGA TCC TCC CCC GGG |

#### 2.4.5.4 Biotinylierte Oligonukleotide, Oligonukleotide zur DIG-Markierung

Die Sequenzen biotinylierter Oligonukleotide und Oligonukleotiden, die mit Digoxigenin markiert (siehe Abschnitt 2.4.8) und zur Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) verwendet wurden, sind der Tabelle 2.4.5.4 zu entnehmen.

**Tabelle 2.4.5.4:** biotinylierte Oligonukleotide, Oligonukleotide zur Markierung mit Digoxigenin

| Oligo             | Genom Koordinaten (B95-8Stamm) | Oligonukleotidesequenz<br>5' 3'            |
|-------------------|--------------------------------|--|
| <b>EBER-1 bio</b> | 6726                           | BIO-AGA CAC CGT CCT CAC CCG GGA CTT GTA    |
| <b>EBER-2 bio</b> | 7027                           | BIO-TTG ACC TCG GGT CGG TAG CAC CGC ACT GA |

#### 2.4.5.5 Oligonukleotide für RT-PCR, 3'-RACE und Sequenzierprimer

Die Sequenzen der Oligonukleotide, die für Sequenzierungen, RT-PCR und 3'-RACE verwendet wurden, sind der Tabelle 2.4.6.5 zu entnehmen:

**Tabelle 2.4.6.5:** Oligonukleotide für Sequenzierungen, 3'-RACE und RT-PCR

| Oligo                                  | Oligonukleotidesequenz<br>5' 3'  |
|--|--|
| <b>T7</b>                              | TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG   |
| <b>SP6</b>                             | ATT TGA GTG CAC TAT AG   |
| <b>S1 -57</b>                          | GCC TAG CAA TGT CAC AGC  |
| <b>S2 +502</b>                         | GGT CCG CAT GTT TTG ATC C  |
| <b>CDS</b>                             | AAG CAG TGG TAA CAA CGC GAG GTA CTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT<br>TTT TTT TTT TVN |
| <b>PCR</b>                             | AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GT   |
| <b>pRep EBNA-1 5'</b>                  | AGG TAC AGG ACC TGG AAA TG   |
| <b>pRep EBNA-1 3'</b>                  | GGT CTC CGG ACA CCA TCT C  |
| <b>LMP2A RT 5' <sup>64</sup></b>       | ATG ACT CAT CTC AAC ACA TA   |
| <b>LMP2A RT 3' <sup>64</sup></b>       | CAT GTT AGG CAA ATT GCA AA   |
| <b>Histon H3.3 RT 3' <sup>23</sup></b> | ATG ACT CAT CTC AAC ACA TA   |
| <b>Histon H3.3 RT 5' <sup>23</sup></b> | CAT GTT AGG CAA ATT GCA AA   |

V: G, C, A

N: A, T, C, G

### 2.4.5.6 Oligonukleotide für EMSA

Die Sequenzen der Oligonukleotide, die für EMSA verwendet wurden, sind der Tabelle 2.4.6.6 zu entnehmen (siehe Abschnitt 2.4.13):

**Tabelle 2.4.6.6:** Oligonukleotide für EMSA

| Oligo               | Genom Koordinaten (B95-8 Stamm) | Oligonukleotidesequenz<br>5' <span style="float: right;">3'</span> |
|---------------------|---------------------------------|--|
| NFW forw            | 6856                            | GCT TAA CGT TGC ATC CCA GAA GAT GC                                 |
| NFW rev             | 6882                            | GCA TCT TCT GGG ATG CAA CGT TAA GC                                 |
| GCF BS forw         | 6472                            | GTA AAA CAC CGA CCG CGC CAC CAG ATG GCA CAC                        |
| GCF BS rev          | 6505                            | GTG TGC CAT CTG GTG GCG CGG TCG GTG TTT TAC                        |
| Eber1 ΔGCF forw     | 6472                            | GTA AAA CAC CGA AGT CTA GAC CAG ATG GCA CAC<br>G                   |
| Eber1 ΔGCF rev      | 6506                            | CGT GTG CCA TCT GGT CTA GAC TTC GGT GTT TTA<br>C                   |
| NFκB forw           | -----                           | AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C                                      |
| NFκB rev            | -----                           | GCC TGG GAA AGT CCC CTC AAC T                                      |
| NFκB mut. forw      | -----                           | AGT TGA GGC GAC TTT CCC AGG C                                      |
| NFκB mut. rev       | -----                           | GCC TGG GAA AGT CGC CTC AAC T                                      |
| SP1 forw            | 6553                            | TAT AGC AAA CCC CGC CCC GTC ACG GTG ACG                            |
| SP1 rev             | 6583                            | CGT CAC CGT GAC GGG GCG GGG TTT GCT ATA                            |
| SP1 mut. forw       | -----                           | ATT CGA TCG GTT CGG GGC GAG C                                      |
| SP1mut. rev         | -----                           | GCT CGC CCC GAA CCG ATC GAA T                                      |
| ATF (B95-8) forw    | 6898                            | ACA ACC GTG ACG TAG CTG TTT ACC CGA A                              |
| ATF (B95-8) rev     | 6925                            | TGC TGG TAA ACA GCT ACG TCA CGG TTG T                              |
| ATF (P3HR1-16) forw | 6898                            | ACA ACC TGT ACG TGG CTG TTT ACC AGC A                              |
| ATF (P3HR1-16) rev  | 6925                            | TGC TGG TAA ACA GCC ACG TCA CGG TTG T                              |

## 2.4.6 DIG-Markierung von Oligonukleotiden

Zur Markierung der Oligonukleotid-Sonden mit Digoxigenin wurden 100 pmol Oligonukleotid, 4  $\mu$ l 5xTdT-Puffer (Boehringer), 4  $\mu$ l 25 mM  $\text{CoCl}_2$  (Boehringer), 1  $\mu$ l Digoxigenin-11-2'-desoxy-Uridin-5'-triphosphat (DIG-dUTP, Boehringer), 1  $\mu$ l 10 mM dATP (Perkin Elmer) und 2  $\mu$ l (2 *units*) Terminale Transferase (TdT, Roche) gemischt und mit Wasser auf 20  $\mu$ l aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C zur Anpolymerisierung von DIG-dUTP und dATP an die 3'-Enden des Oligos wurden die markierten Sonden mit 2  $\mu$ l 0,5 M EDTA (pH 8), 2,5  $\mu$ l 4 M LiCl und 75  $\mu$ l 100 % EtOH für 2 h bei -20 °C gefällt. Nach Zentrifugation für 30 min bei 1440 x g und 4 °C in einer Tischzentrifuge wurde mit 70 % EtOH gewaschen, nochmals wie oben zentrifugiert und die Sonden in 50  $\mu$ l Wasser aufgenommen. Zur Austestung der Markierung wurde 1  $\mu$ l der markierten Sonde in den Verdünnungsstufen 1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000 auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Boehringer) gegeben und quervernetzt (Stratalinker). Danach erfolgte die Visualisierung wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben.

## 2.4.7 Markierung von Oligonukleotiden mit $\gamma\text{-P}^{32}\text{-ATP}$

Bei dieser Reaktion werden die einzelsträngigen oder doppelsträngigen Oligonukleotide am 5'-Ende durch die Übertragung eines radioaktiven Phosphats aus einem ATP radioaktiv markiert.

Der Standard-Ansatz lautete:

- 5 pmol Oligonukleotid
- 4  $\mu$ l  $\gamma\text{-P}^{32}\text{-ATP}$  (~ 5000 Ci/mmol)
- 2  $\mu$ l 10 x T4-Polynukleotidkinase- Puffer
- 1  $\mu$ l T4-Polynukleotidkinase (10 U); *ad* 20  $\mu$ l Wasser

Die Reaktion erfolgte 40 min bei 37 °C im Wasserbad. Anschließend wurde das Enzym 10 min bei 75 °C inaktiviert. Zur Fällung des Oligonukleotides wurden 26  $\mu$ l einer 4 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$ -Lösung, 1  $\mu$ l tRNA (10 $\mu$ g/ $\mu$ l) und 110  $\mu$ l 100 %-iger Ethanol zugegeben. Die Mischung wurde 30 min bei -20 °C inkubiert, 30 min bei 4 °C mit 22700 x g zentrifugiert, mit 100  $\mu$ l 70 %-igem Ethanol gewaschen, erneut 5 min bei 4 °C mit 22700 x g zentrifugiert, getrocknet und in 100  $\mu$ l DEPC-Wasser aufgenommen.

## 2.4.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

### 2.4.8.1 PCR

Bei der Polymerase-Kettenreaktion wird ein ds-DNS-Segment in einer Größenordnung von  $10^5$  Kopien *in vitro* vervielfacht. Je ein komplementäres Oligonukleotid wird an das 3'-Ende der, während der PCR-Reaktion denaturierten, Einzelstränge anhybridisiert und in einer Synthesereaktion in 5'→3'-Richtung verlängert. Durch wiederholtes Aufschmelzen der entstandenen Doppelstränge, Anhybridisierung der Oligonukleotide und der Elongation der Stränge wird der gewählte DNS-Bereich zwischen den Oligonukleotiden amplifiziert. Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 100 µl je nach Verfügbarkeit der Polymerasen durchgeführt und enthielten folgende Komponenten:

| <u>Expand High Fidelity (Roche)</u>            | oder           | <u>SuperScript (PAN)</u>           |
|--|----------------|------------------------------------|
| 10 µl 10 x HF-Puffer                           |                | 10 µl 10 x Puffer                  |
| 10 µl dNTP's (je 2 mM)                         | (Perkin Elmer) | 10 µl dNTP's (je 2mM)              |
| 20 pmol Oligonukleotid 5'                      |                | 20 pmol Oligonukleotid 5'          |
| 20 pmol Oligonukleotid 3'                      |                | 20 pmol Oligonukleotid 3'          |
| 500 ng PCR- <i>template</i>                    |                | 500 ng PCR- <i>template</i>        |
| 0,75 µl Expand High Fidelity (2 <i>Units</i> ) |                | 1 µl SuperScript (2 <i>Units</i> ) |
| <i>ad</i> 100 µl mit Wasser                    |                | <i>ad</i> 100 µl mit Wasser        |

Alle PCR-Reaktionen wurden im PCR-Thermocycler 9600 von Perkin Elmer durchgeführt.

Das Standardprogramm lautete:

|   |           |
|---|-----------|
| 30 sek. 95 °C (Denaturierung des <i>templates</i> )                     |           |
| 45 sek. X °C (Oligonukleotid- <i>annealing</i> , siehe Oligonukleotide) |           |
| 1-3 min 72 °C (Elongation)  | 35 Zyklen |

Am Ende der 35 Zyklen schlossen sich 10 min 72 °C zur vollständigen Elongation und Auffüllung zum Doppelstrang an.



#### 2.4.8.2 RT-PCR

Die Reverse-Transkriptions-(RT)-PCR stellt eine besondere Form der Amplifikation von Nukleinsäuren dar. Hierbei wird RNS in DNS umgeschrieben und amplifiziert.

Unter Zugabe des spezifischen 3'-Oligonukleotids wurde die RNS durch das Enzym M-MLV (Reverse Transkriptase, Perkin Elmer) in DNS umgeschrieben (RT-Erststrangsynthese). Es schloss sich eine weitere, normale DNS-Amplifikation unter Zugabe von Taq-Polymerase (Perkin Elmer) und 5'-Oligonukleotid an. Ein DNase I-Verdau der eingesetzten RNS stellte sicher, dass die amplifizierten Fragmente nur von umgeschriebener RNS stammen konnten.

##### Erststrangsynthese:

- 2 µl Puffer II (Perkin Elmer)
- 4 µl MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer)
- 5 µl dNTP's (Perkin Elmer)
- 30 pmol 3' Oligonukleotid
- 500 ng bis 2 µg RNS
- 1 µl (2,5 *units*) Dnase I
- ad* 19 µl DEPC-Wasser

Nach 15 min Verdau bei 37 °C wurde die DNase I 5 min bei 99 °C inaktiviert.

Dann wurde 1 µl M-MLV (2 *Units*) (Reverse Transkriptase) zugegeben, 30 min bei 42 °C (Reverse Transkription) inkubiert und das Enzym 5 min bei 99 °C inaktiviert.

##### Amplifikation:

Die aus RNS entstandene einzelsträngige cDNS wurde im nachfolgenden Schritt amplifiziert:

Der Standardansatz lautete:

- 20 µl Erststrangsynthese
- 8 µl Puffer II (Perkin Elmer)
- 4 µl MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer)
- 5 µl dNTP's (Perkin Elmer)
- 70 pmol 3' Oligonukleotid
- 100 pmol 5' Oligonukleotid
- 0,5 µl Taq-Polymerase (2,5 *units*) (Perkin Elmer)
- ad* 100 µl mit DEPC-Wasser

Es folgte das PCR-Protokoll:

30 sec. 95 °C (Denaturierung des *templates*)

45 sec. 55 °C (Oligonukleotid-*annealing*)

1 min 72 °C (Elongation)

35 Zyklen

Am Ende der 35 Zyklen schlossen sich 10 min 72 °C zur vollständigen Elongation und Auffüllung zum Doppelstrang an.

#### 2.4.8.3 Quick Change-Mutations PCR

Diese abgewandelte PCR diente dazu, mit geringem Aufwand Mutationen in Plasmide einzuführen. Hierzu wurden zum PCR-Ansatz als Primer zwei Oligonukleotide eingesetzt, die jeweils für den Sinn bzw. den Nicht-Sinn-Strang codierten und die gewünschte Mutation ungefähr in der Mitte enthielten. Als Polymerase wird ein Enzym verwendet, das *proofreading*-Eigenschaften besaß und am Ende der DNS-Polymerisation keine zusätzlichen ATP's anhängte (im Gegensatz zur Taq-Polymerase).

Der Ansatz lautete wie folgt:

5 µl 10 x *native* Pfu plus *buffer*

2 µl dNTP's (Ausgangskonzentration je 2,5 mM) (Perkin Elmer)

200 ng *forward*-Primer

200 ng *reverse*-Primer

50-100 ng DNS-*template*

1 µl Pfu-Polymerase (2U)

*ad* 50 µl Wasser

Das Programm zur Mutations-PCR lautete:

1 min 95 °C (Denaturierung des *templates*)

1 min 60 °C (Oligonukleotid-*annealing*)

je 2 min/Kilobase Plasmid 68 °C (Elongation)

15 Zyklen

Anschließend wurde mit 1 µl *Dpn* I (10 U/µl) die methylierte Ausgangs-DNS eine Stunde bei 37 °C verdaut und die verbleibende, mutierte DNS in DH5α transformiert (siehe Kapitel 2.2.4.2).

#### 2.4.8.4 3'-RACE

**Polyadenylierung mit Poly-A-Polymerase.** EBER-1/2-RNS die nach Kapitel 2.3.4.3 aufgereinigt wurde, wurde mit dieser Reaktion polyadenyliert und für die 3'-RACE-Untersuchung vorbereitet. Die Polyadenylierung erfolgte in folgendem Ansatz:

1 µl 10 x Poly-A-Puffer  
0,75 µl Poly-A-Polymerase (10 U / µl, Sigma)  
2,5 µl MnCl<sub>2</sub> (10 mM: Ausgangskonz.)  
0,5 µl ATP (10 mM: Ausgangskonz.)  
bis zu 5 µl RNS; ad 10 µl Wasser

Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und das Enzym anschließend für 10 min bei 75 °C inaktiviert.

**3'-RACE zur Untersuchung von Modifikationen am 3'-Ende.** 3 µl der polyadenylierten RNS wurden mit 1 µl CDS-Primer (10 mM) und 1 µl DEPC-Wasser für 2 min auf 72 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 2 µl 5 x Erststrang-Puffer, 1 µl DTT, 1 µl dNTP's (10 mM) und 1 µl SuperScript II RT (Gibco), erfolgte die RT-Reaktion für 60 min bei 42 °C. Aus diesem Ansatz wurde die Hälfte in eine PCR zur Amplifikation der cDNS eingesetzt.

5 µl RT-Ansatz  
4,5 µl 10 x PCR II-Puffer (Perkin Elmer)  
3 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM)  
3 µl dNTP's (je 2,5 mM)  
2 µl EBER-1 bzw. EBER-2 5'-Primer (50 pmol)  
1 µl Taq-Polymerase (Perkin Elmer)  
ad 50 µl Wasser

Es folgte das PCR-Protokoll:

45 sek. 95 °C (Denaturierung des *templates*)  
45 sek. 55 °C (Oligonukleotid-*annealing*)  
45 sek. 72 °C (Elongation) 35 Zyklen

Am Ende der 35 Zyklen schlossen sich 10 min 72 °C zur vollständigen Elongation und Auffüllung zum Doppelstrang an.

Das Produkt wurde anschließend TA kloniert (siehe Kapitel 2.2.1) und sequenziert (siehe Kapitel 2.2.2).

### 2.4.9 Primer-Extension zur Untersuchung des 5'-Endes einer RNS

**Primer-Extension Reaktion.** Mit dieser Methode, einer modifizierten Reversen Transkriptions-Reaktion, kann man das genaue 5'-Ende einer RNS bestimmen. Der radioaktiv markierte Primer (50  $\mu$ l) (siehe Kapitel 2.4.8) wurde mit 350  $\mu$ l TEN 600 versetzt. 3,5  $\mu$ l (0,5 pmol) radioaktiv markierter Primer, 10  $\mu$ g RNS, 1,5  $\mu$ l 10 x PCR-Puffer II (Perkin Elmer) und Wasser *ad* 15  $\mu$ l wurden 5 min auf 95 °C aufgeköcht, kurz auf Eis abgekühlt und 90 min bei 55 °C inkubiert. Zu diesem Hybridisierungsansatz wurden 30  $\mu$ l des folgenden Transkriptionsansatzes zugegeben und eine Stunde bei 42 °C inkubiert:

3  $\mu$ l 10 x PCR-Puffer II (Perkin Elmer)

9  $\mu$ l  $MgCl_2$  (25 mM)

2,5  $\mu$ l DTT (100 mM)

1,35  $\mu$ l Actinomycin (5 mg/ml)

2,64  $\mu$ l dNTP's (je 2,5 mM)

0,2  $\mu$ l M-MLV reverse Transkriptase (Perkin Elmer)

11,64  $\mu$ l Wasser

Zum Stoppen der Reaktion wurden 105  $\mu$ l RNase –Mix, bestehend aus 20  $\mu$ g/ml RNase A und 100  $\mu$ g/ml *salmon sperm* DNS in Wasser, zugegeben und 15 min bei 37 °C die enthaltene RNS verdaut. Nach Zugabe von 15  $\mu$ l 3 M NaAc pH 5,5 wurde der Reaktionsansatz mit 150  $\mu$ l PCI ausgeschüttelt, 5 min bei 4 °C mit 22700 x g zentrifugiert, die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 330  $\mu$ l 100 %-igem Ethanol versetzt, 30 min bei –80 °C gefällt und anschließend die ausgefallene DNS 30 min bei 4°C mit 22700 x g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit 100  $\mu$ l 70 %-igem Ethanol gewaschen, 5 min bei 4°C mit 22700 x g zentrifugiert, getrocknet und in 6  $\mu$ l Probenpuffer aufgenommen.

**Visualisierung der Proben.** Die Auftrennung der Proben, die für 5 min bei 95 °C aufgeköcht und kurz auf Eis gekühlt wurden, erfolgte in einem denaturierendem 9 %-igem Harnstoff-Polyacrylamidgel. Nach dem Trocknen des Gels für zwei Stunden wurde über Nacht ein Röntgenfilm (X-omat, Kodak) aufgelegt und in einem Vollautomatischen Filmentwickler (Agfa) entwickelt.

### 2.4.10 RNase-Protection zur Untersuchung einer Verkürzung des 3'-Ende

**Hybridisierung der RNS mit den radioaktiv markierten Sonden.** Hierzu wurden je 1 µl der nach Kapitel 2.4.4 hergestellten radioaktiv markierten Anti-Sense-RNS-Sonden und 1,5 µg Gesamt-RNS in 1 x RP- Hybridisierungs-Puffer (5 x RP- Hybridisierungs-Puffer mit vier Teilen Formamid verdünnt) im 20 µl Ansatz vereint, 5 min bei 95 °C aufgeköcht und über Nacht bei 40 °C hybridisiert.

**Degradation der freien, einzelsträngigen RNS.** Nach Degradation der nicht hybridisierte RNS für 45 min bei 37 °C mit 330 µl RNase-Digestion-Puffer, wurden 20 µl 10 %-iges SDS zugegeben und mit 3 µl Proteinase K (20 µg/µl) für 15 min bei 37 °C die enthaltenen Proteine verdaut. Die Ansätze wurden mit einem Volumen PCI ausgeschüttelt und die wässrige Phase mit 1 ml 100 %-igem Ethanol und 1 µl tRNS (10 µg/µl) gefällt. Der Niederschlag, der sich durch zentrifugieren mit 22700 x g bei 4°C für 30 min absetzte, wurde mit 500 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen, nochmals für 5 min bei Raumtempertatur mit 22700 x g zentrifugiert, getrocknet und in 10 µl Auftragspuffer aufgenommen.

**Visualisierung der Proben.** Die Proben wurden auf einem 12,5 %-igem Polyacrylamidgel ca. eine Stunde bei 20 mA aufgetrennt. Nach dem Trocknen des Gels wurde ein X-OMAT-Röntgenfilm über Nacht aufgelegt und am nächsten Tag in einem vollautomatischen Filmentwickler (Agfa) entwickelt.

### 2.4.11 DNase I *in vitro* Footprint

Für den DNase I *in vitro* Footprint benötigt mann ein 100-500 Bp langes doppelstängiges DNS-Fragment, das nur an einem Ende radioaktiv markiert ist. Da mit den üblichen Markierungsmethoden immer beide Enden markiert werden, muss die Markierung an einem Ende nachträglich wieder abgespalten werden (Nachverdau). Das Klenow-Enzym arbeitet in allen Restriktionspuffern befriedigend gut, so dass die Markierungsreaktion im Puffer des Nachverdaus ausgeführt wurde.

**Radioaktive Markierung der DNS.** DNS-Fragmente, die präparativ gespalten (siehe Kapitel 2.2.1) und aus Agarosegelen aufgereinigt (siehe Kapitel 2.2.1) worden waren, wurden durch Auffüllen der 3'-Enden mit einem radioaktiven Nukleotid für 30 min bei Raumtemperatur in folgendem Ansatz markiert:

- ca. 3 µg DNS
- 1 µl dNTP's (je 2 mM)
- 5 µl  $\alpha$ - $P^{32}$ -dATP (~ 3000 Ci/mmol)
- 1 µl Klenow-Enzym (10 U/µl ;NEB)
- 2 µl 10 x Restriktionsenzympuffer des Nachverdaues;      *ad* 20 µl H<sub>2</sub>O

Nach Zugabe von 1 µl zusätzlichen dNTP's (je 2 mM) und 5 min Inkubation bei 37 °C wurde das Enzym bei 75 °C für 15 min inaktiviert.

Der Nachverdau, bei dem die Markierung an einem Ende wieder abgespalten wurde, erfolgte mit einem geeigneten Restriktionsenzym im 50 µl-Ansatz für zwei Stunden bei 37 °C. Die so gewonnenen DNS-Fragmente wurden in einem Agarosegel aufgetrennt (siehe Kapitel 2.4.1.) und mit *QIAquick* aufgereinigt (siehe Kapitel 2.2.1). Das Endvolumen, in dem die markierten DNS-Fragmente gelöst waren, betrug 50 µl und wurde zu je 1 µl in die DNase I *in vitro Footprint*-Reaktionen eingesetzt.

**G+A-Sequenzier-Reaktion.** Zur G+A-Sequenzierung wurden 2 µl markierte DNS, 2 µl Kalbs-Thymus-DNS (0,5 µg/µl), 1 µl TE-Puffer, 5 µl Wasser und 1 µl 4 %-ige Ameisensäure 25 min bei 37 °C inkubiert. Nach kurzem Abkühlen auf Eis und Zugabe von 150 µl 1 M Piperidin wurde die Probe für 30 min auf 90 °C erhitzt. Der für 5 min auf Eis abgekühlte Ansatz wurde mit 1 ml Butanol versetzt, gut gemischt, 2 min bei 22700 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 150 µl 1 %-igem SDS und 1 ml Butanol wurde wieder gut gemischt, 2 min bei 22700 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde noch zweimal mit 500 µl Butanol gewaschen, 10 min in einer *Speed Vac* getrocknet und in 10 µl *footprint*-Auftragspuffer aufgenommen.

**DNase I *in vitro footprint*.** Folgender Ansatz wurde zum Nachweis von Proteinbindungen an 3'-markierte DNS-Fragmente erstellt:

- 25 µl 2 x Reaktionspuffer
- 1 µl 3'-markierte DNS-Fragmente
- 1 µl d(IC) (1 µg/µl) (Pharmacia)
- 20 µg Kernextrakt;      *ad* 50 µl Wasser

Dieser Ansatz wurde 20 min auf Eis inkubiert und 2 min auf 25 °C erwärmt. Nach Zugabe von 5 µl Co-Faktor-Lösung wurde mit 0,04 / 0,08 / 0,16 U DNase I für genau eine min bei Raumtemperatur verdaut. Diese Reaktion wurde mit 100 µl Stop-Lösung unterbunden und nach Zugabe von 1,5 µl Proteinase K (20µg/µl) die enthaltenen Proteine für 10 min bei 42 °C verdaut. Anschließend wurde das Enzym 2 min bei 90 °C inaktiviert und der Ansatz mit PCI

ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µl 100 %-igem Ethanol versetzt und 20 min bei –80 °C die DNS gefällt. Der durch Zentrifugation bei 4 °C mit 22700 x g für 20 min entstandene Niederschlag wurde mit 500 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur mit 22700 x g für 5 min zentrifugiert, in einer *Speed Vac* für 10 min getrocknet und in 3 µl *footprint*-Auftragspuffer aufgenommen.

**Sequenzgel.** Die Proben und die Sequenzierreaktion wurden 5 min bei 95 °C aufgeköcht, kurz auf Eis abgekühlt und auf ein 8 %-iges Harnstoffpolyacrylamid-Gel aufgetragen (siehe 2.4.1). Der Gellauf wurde bei 1500 V solange durchgeführt, bis die Bande des Bromphenolblau am unteren Ende der Glasplatten angekommen war. Nach Trocknung des Gels wurde ein X-omat Röntgenfilm (Kodak) über Nacht bei –80 °C in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie aufgelegt und an einem vollautomatischen Filmentwickler (Agfa) entwickelt.

#### 2.4.12 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Der Nachweis von Proteinbindungen an DNS erfolgt auch im EMSA. Hierzu wurden je 100 pmol zweier entgegengesetzter Oligonukleotide im 100 µl-Ansatz in Puffer H (Roche 10 x Restriktionspuffer) durch Erhitzen auf 95 °C für 5 min und langsames abkühlen auf Raumtemperatur hybridisiert. Diese nach Kapitel 2.4.7 markierten doppelsträngigen Oligonukleotide wurden nach folgendem Ansatz mit Kernextrakt (KE) inkubiert (siehe Tabelle 2.4.12):

**Tabelle 2.4.12:** Zusammensetzungen der EMSA-Experimente

|                    | Faktor     |          |          |          |          |                              |
|--------------------|------------|----------|----------|----------|----------|------------------------------|
|                    | allgemein  | NFW      | NFκB     | GCF      | ATF      | SP1                          |
| d(IC)              | 100ng-2 µg | 300 ng   | 200 ng   | 100 ng   | 200 ng   | 400 ng                       |
| 2 x BP             | 10 µl      | 10 µl    | 10 µl    | 10 µl    | 10 µl    | 10 µl                        |
| KE                 | 5-10 µg    | 5 µg     | 5 µg     | 5 µg     | 5 µg     | 5 µg                         |
| unspez. Kompetitor | 2 µl       | 2 µl     | 2 µl     | 2 µl     | 2 µl     | 2 µl <sup>⋈</sup> * (2 pmol) |
| spez. Kompetitor   | 2 µl       | 2 µl     | 2 µl     | 2 µl     | 2 µl     | 2 µl <sup>⋈</sup> * (2 pmol) |
| Wasser             | ad 20 µl   | ad 20 µl | ad 20 µl | ad 20 µl | ad 20 µl | ad 20 µl                     |

\* : 40 x markiertes Oligo

---

Dieser Ansatz wurde 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1  $\mu$ l (50 fmol) markiertem Oligonukleotid wurde nochmals für 20 min auf Eis inkubiert und schließlich nach Zugabe von 5  $\mu$ l Auftragspuffer die Proben in einem 5 %-igem Polyacrylamidgel (siehe 2.4.1) für ca. 1-2 Stunden bei 30 mA im Kühlraum aufgetrennt. Nach Trocknung des Gels wurde ein X-omat Röntgenfilm (Kodak) über Nacht bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie aufgelegt und an einem vollautomatischen Filmentwickler (Agfa) entwickelt.



### 3 Ergebnisse

Die Gene EBER-1 und EBER-2 werden beim Übergang von der Latenz in die virale Replikation unterschiedlich reguliert: EBER-1 wird abgeschaltet, EBER-2 weiter transkribiert. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie es molekularbiologisch zu dieser unterschiedlichen Regulation kommt (siehe Kapitel 3.1 und 3.2). Mit DNase I *in vitro Footprint* (siehe Kapitel 3.2.2) und EMSA (siehe Kapitel 3.2.4) sollten beteiligte Faktoren gefunden werden. Da unklar war, ob virale Proteine an dieser Regulation beteiligt waren, musste der funktionelle Nachweis (*Nuclear Run On*; Siehe Kapitel 3.1.3) sowohl in EBV-negativen als auch in EBV-positiven Zellen durchgeführt werden. Für die Untersuchung der Regulation der EBER-Transkripte in EBV-positiven Zellen musste ein eigenes Reportersystem erstellt werden (siehe Kapitel 3.1), das eine Unterscheidung der natürlich vorkommenden EBERs von den plasmidcodierten Transkripten erlaubte.

Der 2. Teil der Arbeit beschäftigt sich mit einem Paradoxon der EBER-Regulation: Welchen Sinn macht es, wenn EBER-1 beim Übergang von der Latenz in die virale Replikation abgeschaltet wird, wenn die Transkripte auch noch nach mehreren Tagen nach der Induktion der viralen Replikation in nahezu unveränderten Konzentrationen nachgewiesen werden können? Eine Erklärung für diesen Umstand wäre, dass die Transkripte funktionell nicht mehr aktiv waren. Da aber die Funktion der EBER-Transkripte noch unklar ist, wurden die Transkripte selbst auf mögliche Modifikationen untersucht (siehe Kapitel 3.3). Eine andere Möglichkeit läge darin, dass die Transkripte in der Latenz und der produktiven Phase des EB-Virus an unterschiedlichen Orten in der Zelle lokalisiert waren und dadurch deren Funktion gestört wurde (siehe Kapitel 3.4). Diese unterschiedliche Lokalisation könnte auch zu geändertem Metabolismus der Transkripte führen und die Erhöhung der Halbwertszeit bedingen.

#### **3.1 Analyse der Transkriptionsaktivität von EBER-1 und EBER-2 in EBV-positiven und –negativen Zellen**

Die kommerziellen Reportersysteme sind auf Polymerase II ausgelegt, bei der in der Regel alle für die Transkription wichtigen Bindestellen der Transkriptionsmaschinerie vor der kodierenden Sequenz der Gene liegen. In diesen Systemen ist eine Testung unterschiedlicher regulatorischer

Bereiche im Zusammenhang mit einem nachgeschalteten konstanten Reporter-Gen / -Protein möglich. Die EBER-RNS wird von Polymerase III transkribiert. Für diese Polymerase gibt es keine Reporter-Systeme, da Polymerase III-typische regulatorische Elemente (Box A und Box B) nach dem Transkriptionsstart im kodierenden Bereich der Gene liegen, wodurch keine Trennung von zu testendem regulatorischen Bereich und einem konstanten Reportergen möglich ist. Zusätzlich befinden sich bei den EBER-Genen weitere wichtige Bindestellen auch vor der codierenden Sequenz (Polymerase II- typisch). Zur funktionellen Untersuchung der EBERs in EBV-positiven Zellen musste daher ein eigenes Reportersystem hergestellt werden. Dieses wurde mit Hilfe einer Verlängerung der codierenden Sequenzen der EBER-1- und EBER-2-Transkripte realisiert. Mit dieser Verlängerung der EBER-Transkripte sollten nach Transfektion der Reporterplasmide in EBV positive Zellen die endogenen EBER-Transkripte von den EBER-Reporter-Transkripten im *Nuclear Run On*-Experiment, unterschieden werden können.

### 3.1.1 Klonierung eines EBER-Reporter-Systems

**Klonierung von Reporterplasmiden zur transienten Transfektion.** Zur Klonierung des EBER-Reporters wurde folgende Strategie ausgearbeitet (siehe auch Abbildung 3.1.1.1):

Zuerst wurde der Bereich der EBER-Gene des EBV-Genoms (B95-8-Stamm: 6202 bis 7312) mit Hilfe der PCR (*Expand High Fidelity*) amplifiziert (siehe Kapitel 2.4.9.1). Die Primer<sup>1</sup> enthielten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Spe* I und *Hind* III, über welche das Fragment in das Plasmid pLitmus28 kloniert wurde (pLit EG plus). Zur Verlängerung der codierenden Sequenz von EBER-1 wurde nun mittels *Quick Change* PCR (siehe Kapitel 2.4.9.3) an der Position 6715 (bezogen auf den B95-8-Stamm) in der Mitte von EBER-1 eine *Eco* R I-Schnittstelle<sup>2</sup> erzeugt. Das mittels PCR (SuperScript) aus dem Plasmid pCMV/Seap amplifizierte (siehe Kapitel 2.4.9.1) Fragment IVSeapE1<sup>3</sup>, in das durch die Primer an den Flanken Schnittstellen für *Eco* R I eingeführt wurden, wurde zur Verlängerung eingefügt (pLit EG plus EBER-1 tag(S)). Zur Verlängerung der codierenden Sequenzen von EBER-2 wurde mittels *Quick Change* PCR (siehe Kapitel 2.4.9.3) an der Position 7178 eine *Bam* H I-Schnittstelle<sup>4</sup> erzeugt. In diese Schnittstelle

---

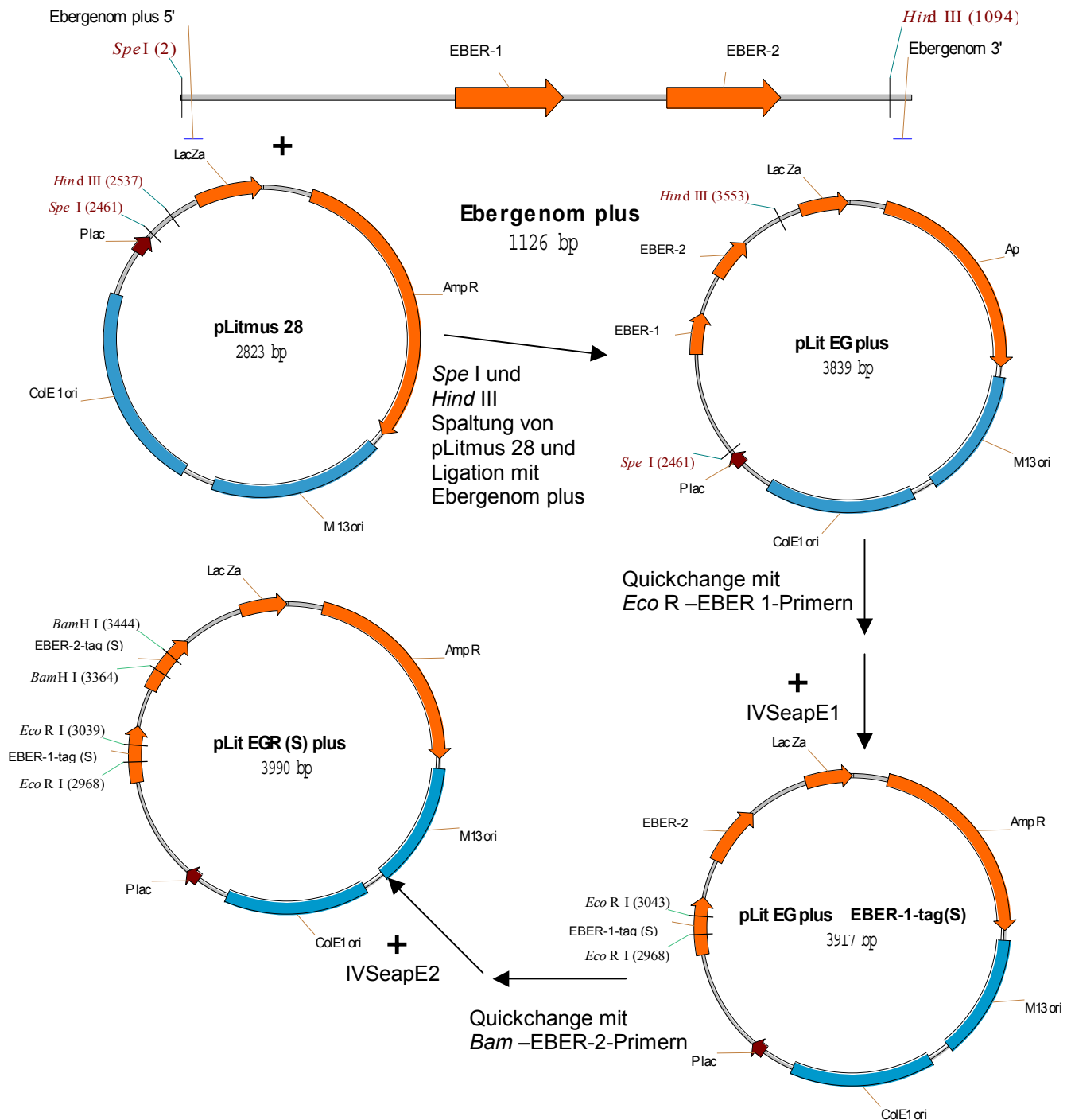
<sup>1</sup> EBERgenom +5' und EBERs 3'

<sup>2</sup> Eco-EBER-1 forw und Eco-EBER-1 rev

<sup>3</sup> IVSeapE1 5' und IVSeapE1 3'

<sup>4</sup> Bam-EBER-2 forw und Bam-EBER-2 rev

wurde das Fragment IVSeapE2<sup>5</sup>, das mit PCR (SuperScript) aus dem Plasmid pCMV/Seap amplifiziert (siehe Kapitel 2.4.9.1) und durch die Primer mit einer *Bam* H I -Schnittstelle an den Enden versehen wurde, eingefügt (pLit EGR(S) plus). Die Verlängerung bei EBER-1 betrug 85 Bp und bei EBER-2 94 Bp.



**Abbildung 3.1.1.1: Klonierung eines EBER-Reportersystems.** Eine detaillierte Beschreibung der Klonierung ist dem Abschnitt 3.1.1 zu entnehmen.

<sup>5</sup> IVSeapE2 5' und IVSeapE2 3'

**Modifizierte Konstrukte mit Replikon zur besseren Persistenz nach transienten Transfektionen bzw. für stabile Zelllinien.** Der Bereich der EBER-Gene wurde zur besseren Persistenz nach transienten Transfektionen aus dem Plasmid pLitmus 28 in den Vektor pRep 9 kloniert. Das Plasmid pRep 9 codiert für den EB-viralen OriP und das EBNA-1 Protein von EBV, was zu einer besseren Persistenz der Plasmide führt. Dem Bereich der EBER-Reporter (pLit EGR (S) plus) und dem Bereich der EBER-Gene (pLit EG plus) wurden mit PCR (siehe Kapitel 2.4.9.1; *Expand High Fidelity*) Schnittstellen für *Xba* I und *Not* I<sup>6</sup> angefügt. Die PCR-Fragmente LTR2 (S) und LTR2 wurden über diese Schnittstellen in das Plasmid pRep9 umgesetzt (pRep EGR II (S) plus bzw. pRep EG II plus). Da auf dem Plasmid pRep 9 auch eine Genitacin-Resistenz codiert ist, können mit diesen Konstrukten auch stabile Zelllinien generiert werden.

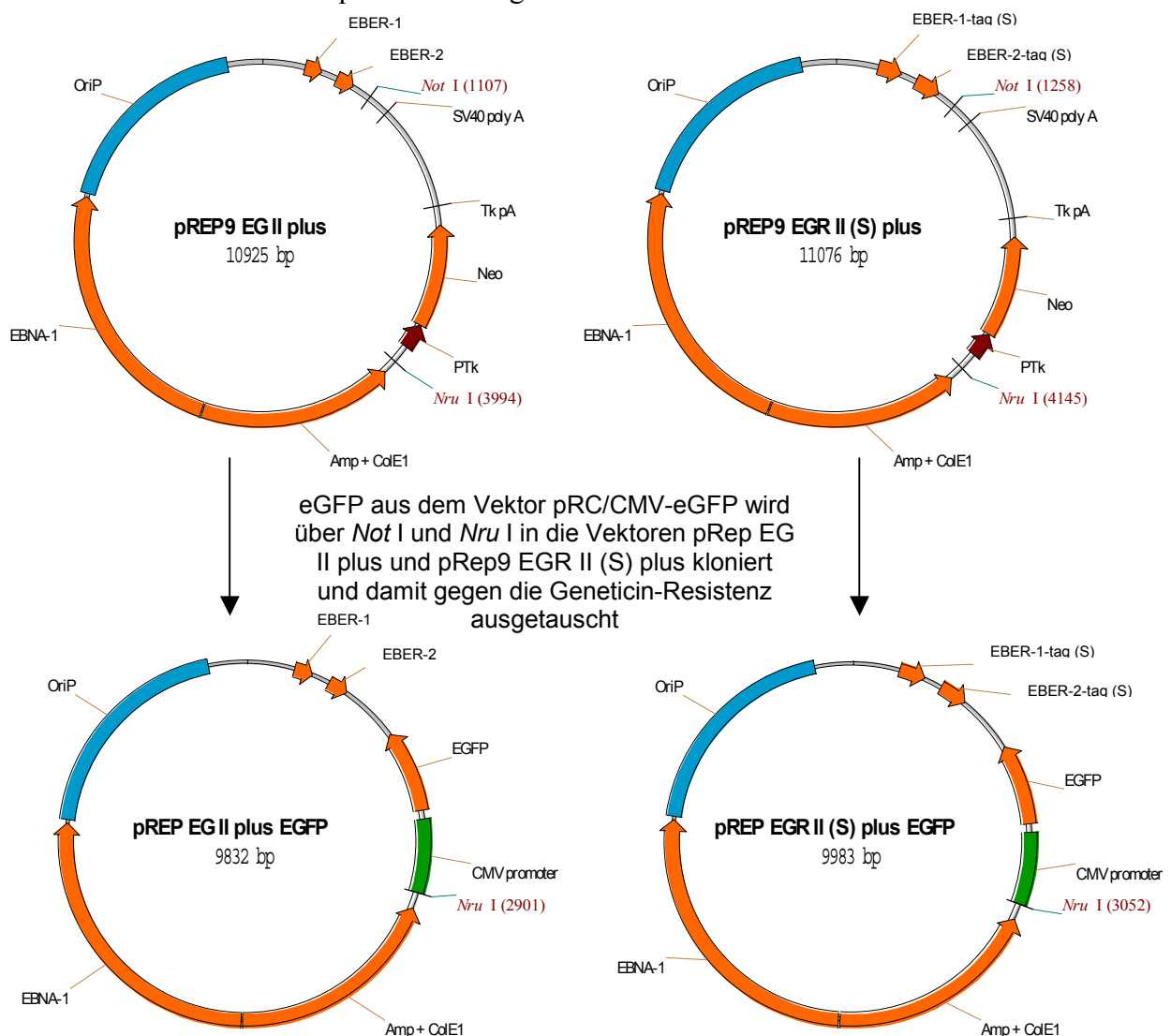


**Abbildung 3.1.1.2: Modifizierte Konstrukte mit Replikon zur besseren Persistenz nach transienten Transfektionen bzw. für stabile Zelllinien.** Eine detaillierte Beschreibung der Klonierung ist dem Abschnitt 3.1.1 zu entnehmen.

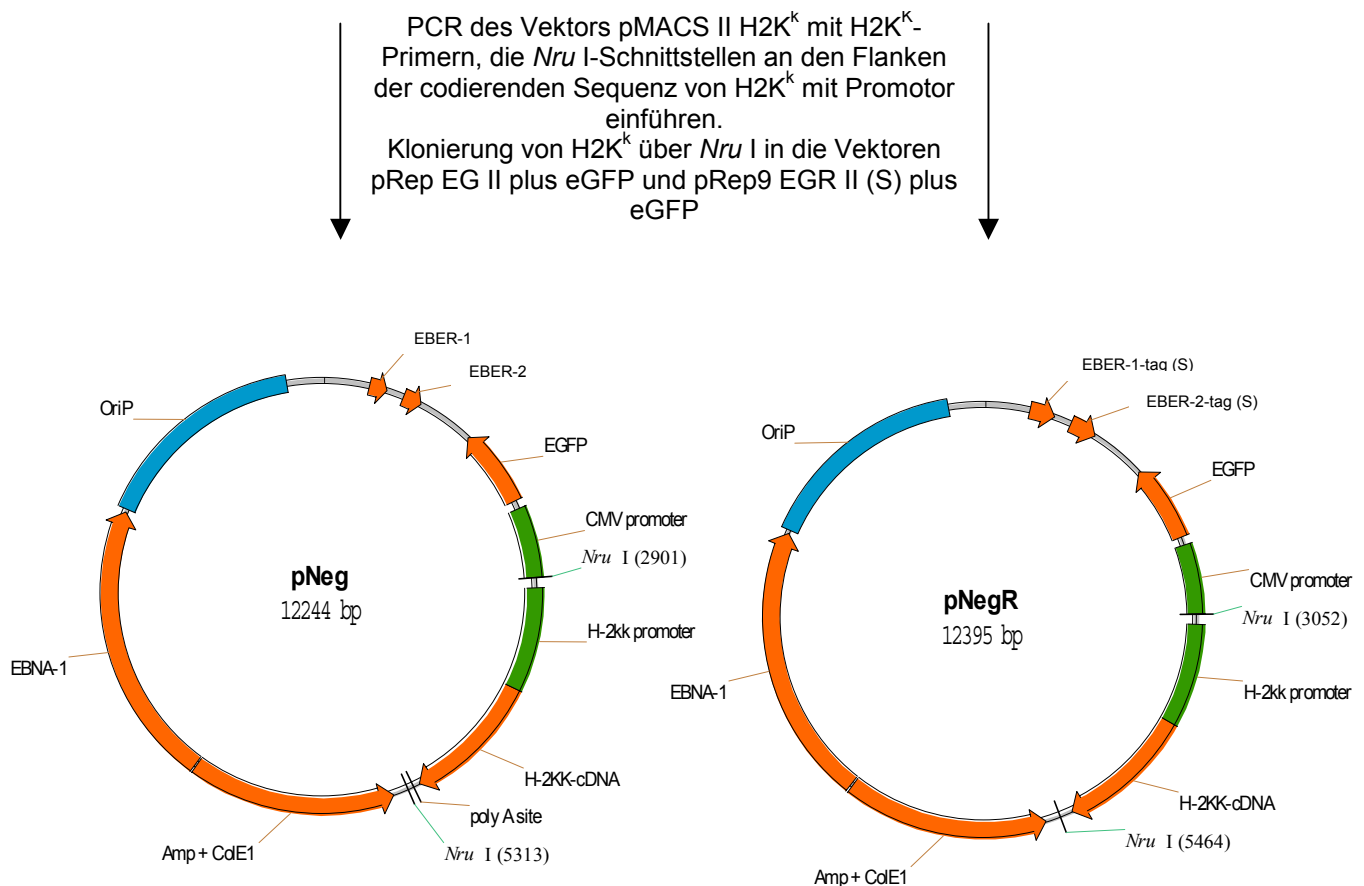
<sup>6</sup> LTR2\* 5' und LTR2 3'

**Modifizierte Konstrukte zur Erzeugung einheitlich transfizierter Zell-Populationen ohne die Herstellung stabiler Zelllinien.** Um einheitlich transfizierte Populationen ohne den zeitraubenden Umweg über stabile Zelllinien zu erhalten, wurden die Konstrukte pRep EGR II (S) plus bzw. pRep EG II plus weiter modifiziert. Zur Transfektionskontrolle wurde aus dem Plasmid pRc/CMV-eGFP die kodierende Sequenz für das fluoreszierende eGFP-Protein mit *Nru* I und *Not* I herausgeschnitten und über diese Schnittstellen gerichtet gegen die Genizitin-Resistenz ausgetauscht ( pRep EGR II (S) plus und pRep EG II plus).

Zur Aufreinigung der transfizierten Zellen wurde ein verkürzter Maus-Oberflächenmarker (H2K<sup>k</sup>) über *Nru* I-Schnittstellen eingesetzt (pNeg und pNegR). Die kodierende Sequenz mit Promoter für das H2K<sup>k</sup> stammte aus dem pMACS II K<sup>k</sup> (Miltenyi Biotec) und wurde mittels PCR (siehe Kapitel 2.4.9.1; *SuperScript*) amplifiziert und über die Primer<sup>7</sup> mit *Nru* I-Schnittstellen versehen. Nun konnten die transfizierten Zellen erkannt und aufgereinigt werden und so eine einheitliche Population erzeugt werden.



<sup>7</sup> H2K<sup>k</sup> 5' und H2K<sup>k</sup> 3'



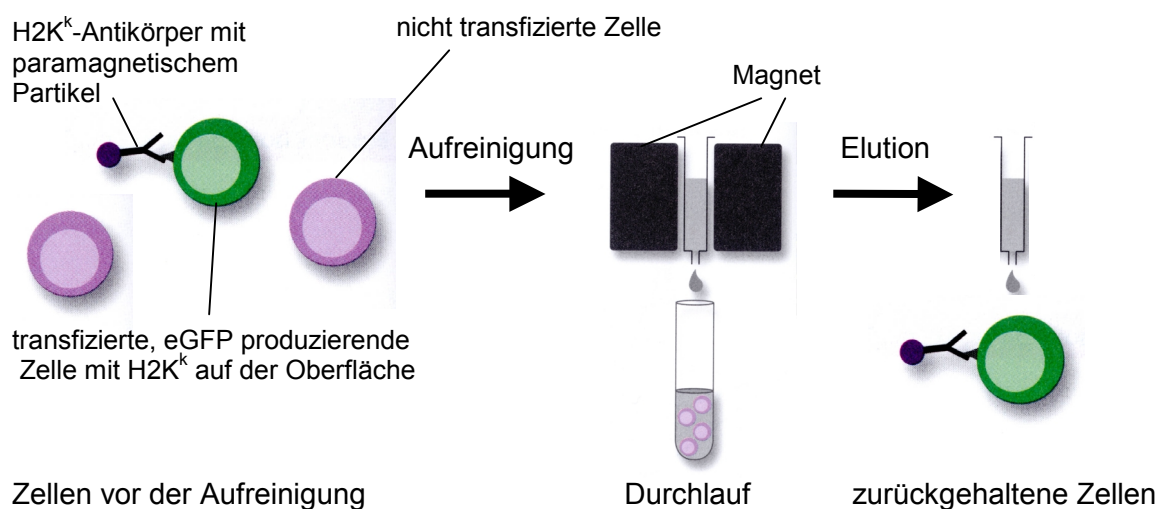
**Abbildung 3.1.1.3: Modifizierte Konstrukte zur Erzeugung einheitlich transfizierter Populationen ohne die Herstellung stabiler Zelllinien.** Eine detaillierte Beschreibung der Klonierung ist dem Abschnitt 3.1.1 zu entnehmen

### 3.1.2 Die Aufreinigung über H2K<sup>k</sup>-Oberflächenmarker führte zu Populationen mit 95 % transfizierten Zellen

Mit den nach Kapitel 3.1.2 erstellten Konstrukten konnte nun die Expression der EBER-Gene (pNeg) in EBV-negativen und der EBER-Reporter-Transkripte (pNegR) in EBV-positiven Zellen untersucht werden. Durch die Expression des eGFP konnte durch das Leuchten der Zellen die Transfektionseffizienz bestimmt werden. Die Elektroporation, mit der die Plasmide in die Zellen eingeführt wurden, führte nur zu einer Transfektionseffizienz von ca. 30 %, abhängig von der Größe der Plasmide und von den Zellen. Um im *Nuclear Run On*-Experiment eine einheitliche Population einzusetzen, mussten die transfizierten Zellen aufgereinigt werden. Dies

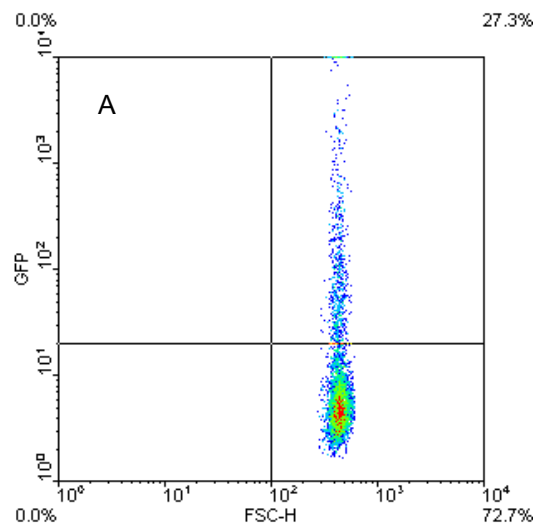
wurde über den exprimierten Maus MHC H2K<sup>k</sup> durchgeführt. Im FACS konnte anschließend die Reinheit der Populationen untersucht werden.

Je  $12 \times 10^7$  DG 75-Zellen und P3HR1-16-Zellen wurden durch Elektroporation (siehe Kapitel 2.3.2) mit den Plasmiden pNeg bzw. pNegR transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die noch lebenden Zellen (ca.  $6 \times 10^7$ ) über ein Ficoll-Kissen geerntet. Über das Maus MHC H2K<sup>k</sup>, das in den Zellen durch die Plasmide exprimiert wurde, wurden die transfizierten Zellen aufgereinigt (ca.  $2 \times 10^7$ ) (siehe Kapitel 2.3.3.1) und im FACS auf das Leuchten des eGFP hin untersucht. Die Aufreinigung ist in Abbildung 3.1.2.1 dargestellt.



**Abbildung 3.1.2.1: Schematische Darstellung der Aufreinigung über das Maus MHC H2K<sup>k</sup>.** Nach Abtrennung der toten Zellen über ein Ficoll-Kissen wurden die transfizierten Zellen mit einem Anti-H2K<sup>k</sup>-Antikörper markiert und im Magnetfeld die transfizierten von den nicht transfizierten Zellen abgetrennt.

Nach der Aufreinigung wurde die Homogenität der Zellpopulation mit FACS-Analysen untersucht (siehe Kapitel 2.3.4). Die Zellen wurden noch zwei Tage kultiviert und dann von einem Teil der Zellen ( $1 \times 10^7$ ) die Kerne präpariert (siehe Kapitel 2.3.5). Vom Rest der Zellen ( $2 \times 10^7$ ) wurden die Kerne erst nach Induktion der lytischen Virusvermehrung mit TPA/BS/TGF- $\beta$  für drei Tage (siehe Kapitel 2.3.1) präpariert. Es musste mit  $2 \times 10^7$  Zellen vor der Induktion begonnen werden, da bei der Induktion der viralen Replikation nach drei Tagen ca. 50 % der Zellen tot waren und somit für die Präparation der induzierten Zellen auch  $1 \times 10^7$  zur Verfügung standen. Die Ergebnisse der FACS-Analysen nach der Aufreinigung und vor der Kernpräparation sind in Abbildung 3.1.2.2 dargestellt.

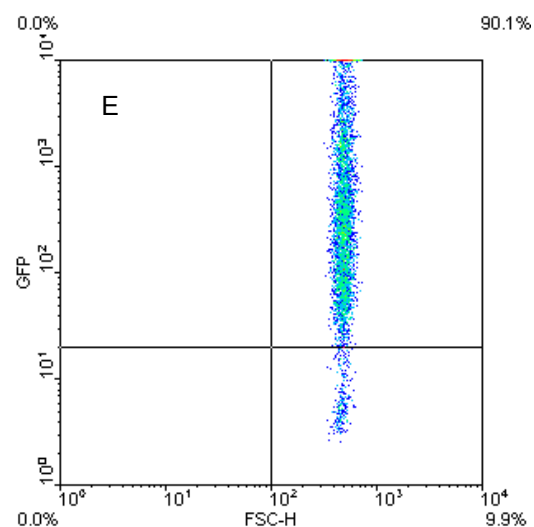
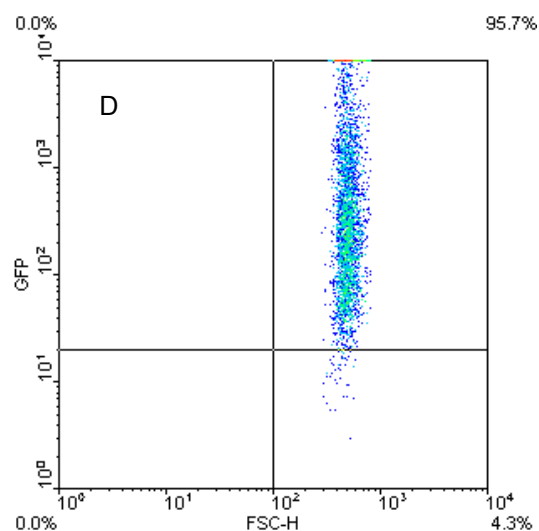
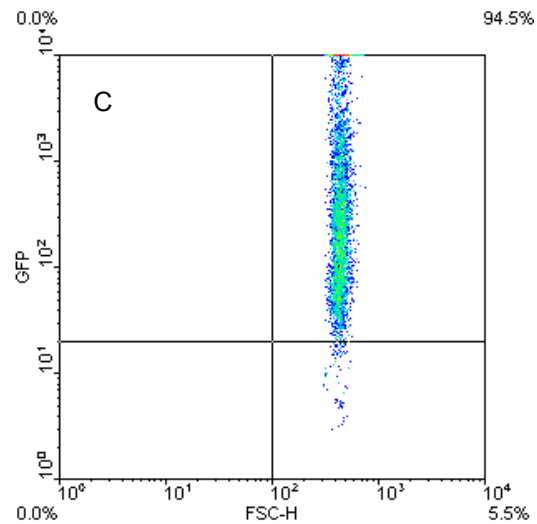
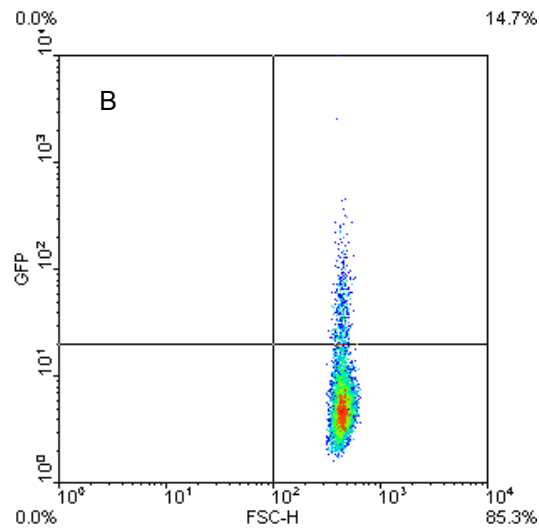


**Abbildung 3.1.2.2: Die Ergebnisse der FACS-Analysen zur Beurteilung der Aufreinigung der transfizierten EBV-negativen Zellen.** Je  $1 \times 10^4$  Zellen wurden für die FACS-Analyse verwendet. Aus den mit pNeg transfizierten DG 75-Zellen wurden die nach 48 Stunden noch lebenden Zellen über ein Ficollkissen gereinigt (A). Die lebenden Zellen wurden mit einem Anti-H2K<sup>k</sup>-Anti-körper (*bead*-gekoppelt) markiert und mit dem MACS-System aufgereinigt (B: Negativfraktion; C: Positivfraktion). Vor der Kernpräparation der latenten (D) und induzierten (E) DG75 wurde nochmals eine FACS-Analyse durchgeführt.

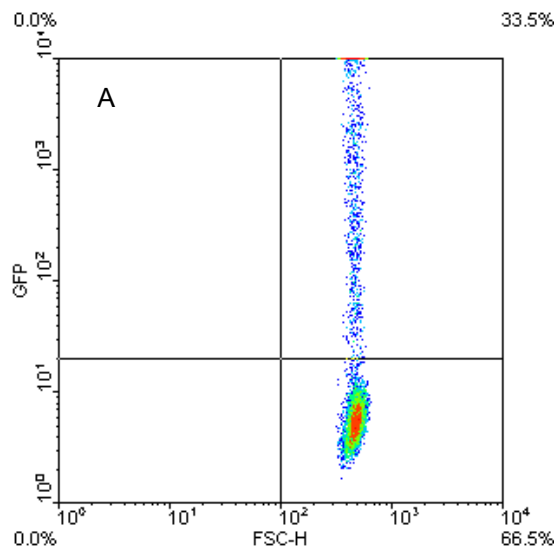
unten rechts: nicht leuchtende Zellen, d.h. Plasmid wird nicht (mehr) exprimiert  
oben rechts: leuchtende Zellen, d.h. Plasmid wird exprimiert

X-Achse: Größe der Zellen;

Y-Achse: Leuchtintensität des eGFP







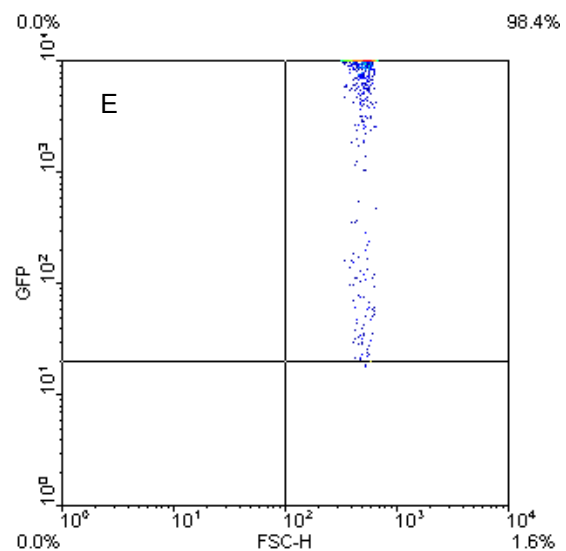
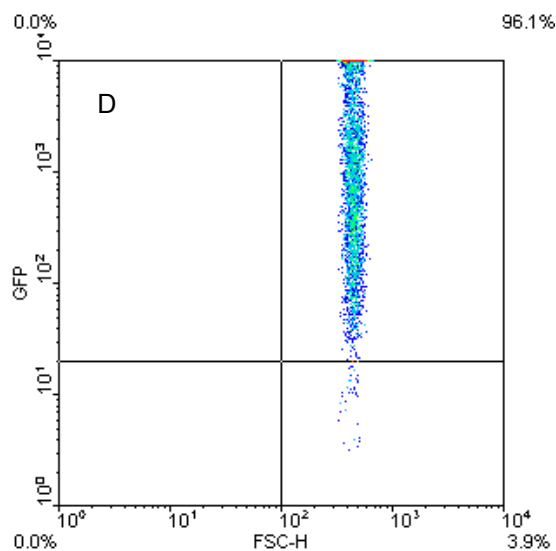
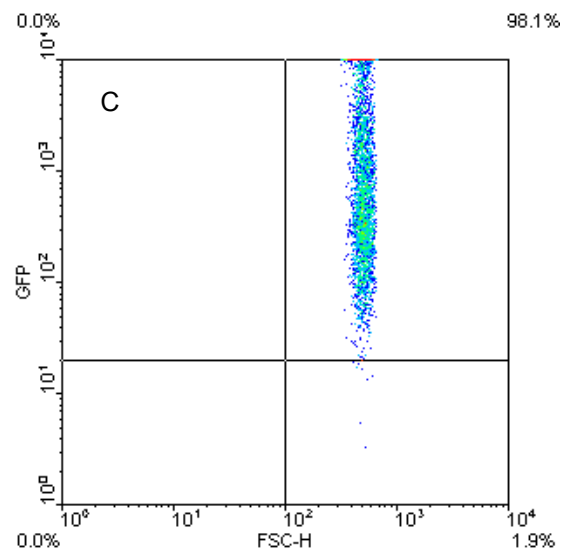
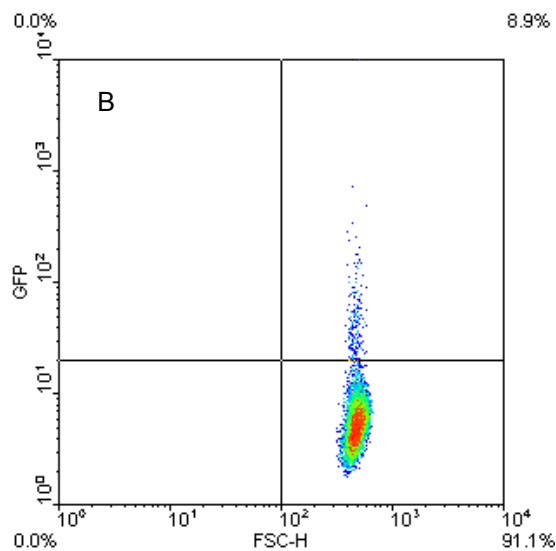
**Abbildung 3.1.2.3: Die Ergebnisse der FACS-Analysen zur Beurteilung der Aufreinigung der transfizierten EBV-positiven Zellen.** Je  $1 \times 10^4$  Zellen wurden für die FACS-Analyse verwendet. Aus den mit pNegR transfizierten P3HR1-16-Zellen wurden die nach 48 Stunden noch lebenden Zellen über ein Ficollkissen gereinigt (A). Die lebenden Zellen wurden mit einem Anti-H2K<sup>k</sup>-Anti-körper (*bead*-gekoppelt) markiert und mit dem MACS-System gereinigt (B: Negativfraktion; C: Positivfraktion). Vor der Kernpräparation der latenten (D) und induzierten (E) P3HR1-16 wurde nochmals eine FACS-Analyse durchgeführt.

unten rechts: nicht leuchtende Zellen, d.h. Plasmid wird nicht (mehr) exprimiert

oben rechts: leuchtende Zellen, d.h. Plasmid wird exprimiert

X-Achse: Größe der Zellen;

Y-Achse: Leuchtintensität des eGFP



Die Transfektionseffizienz war bei beiden Zelllinien mit ca. 30 % ungefähr gleich hoch (jeweils A). Mit der Aufreinigung der transfizierten Zellen über den exprimierten Maus MHC H2K<sup>k</sup> konnten nur die Zellen erreicht werden die eine gewisse Menge dieses Oberflächenmarkers exprimierten (ca. 50-70 %; jeweils B verglichen mit A). Die Populationen waren nach der Aufreinigung sehr einheitlich in Bezug auf die Fluoreszenz des eGFP (95 % positiv; jeweils C), d.h. nahezu alle Zellen, die für das *Nuclear Run On*-Experiment eingesetzt wurden, enthielten das EBER- bzw. das EBER-Reporter-Expressionsplasmid.

Durch Behandlung der Zellen mit TPA/BS/TGF- $\beta$  zur Induktion wurden sehr viele Promotoren angeschaltet. Auch der CMV-Promotor war davon betroffen. Somit erhöhte sich bei Induktion das Signal des eGFP, da dieses Gen von einem CMV-Promotor reguliert wurde. Bei der transfizierten Zelllinie DG75 war nach Induktion der lytischen Replikation keine Änderung der Expression von eGFP zu erkennen (Vergleich D und E), da sich hier das Ausdünnen des Plasmids aus den Zellen mit der Induktion der eGFP-Produktion die Waage hielt. Anders hingegen bei der Zelllinie P3HR1-16, bei der nach Induktion (Vergleich D und E) so viel eGFP produziert wurde, dass die Zellen so stark leuchteten, dass viele aus dem Detektionsfenster nach oben verschwunden waren.

### **3.1.3 *Nuclear Run On* –Experimente zeigten eine aktive Transkription von EBER-2, nicht aber von EBER-1, in Zellen mit produktiver Virusvermehrung**

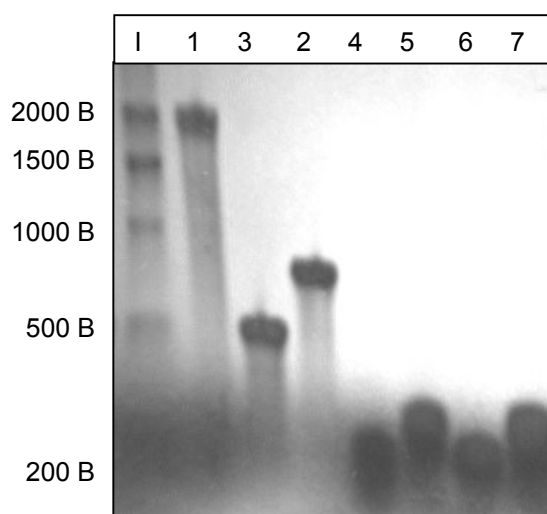
Der *Nuclear Run On* liefert eine Momentaufnahme der Transkriptionsaktivität im Zellkern und war die funktionelle Nachweismethode für die Untersuchung der Regulation der EBER-Gene. Für diesen Versuch wurden die Kerne der zu untersuchenden Zellen präpariert und die Expression der RNS *in vitro* mit radioaktiv markiertem Nukleotid für kurze Zeit fortgesetzt. Die so produzierte, radioaktiv markierte RNS wurde an Sonden für die zu untersuchenden RNS-Transkripte, die auf einer Membran immobilisiert wurden, hybridisiert, gewaschen und detektiert. Als Sonden für die im *Run On* produzierte RNS dienten Anti-Sense-Sonden der Gene  $\beta$ -Aktin, eGFP, tRNS Serin, EBER-1, EBER-2, EBER-1-tag(S) und EBER-2-tag(S). Die genomischen Fragmente für  $\beta$ -Aktin und tRNS Serin wurden mit PCR amplifiziert (siehe Kapitel 2.4.9.1; *SuperScript*) und in den pCR II-TOPO-Vektor kloniert (siehe Kapitel 2.2.4). Die codierenden Sequenzen von EBER-1, EBER-2, EBER-1-tag(S) und EBER-2-tag(S) wurden mit

PCR (siehe Kapitel 2.4.9.1; *SuperScript*) aus den Vektoren pLit EG plus bzw. pLit EGR(S) plus amplifiziert und ebenfalls in den pCR II-TOPO-Vektor kloniert. Die Anti-Sense-Sonde für eGFP wurde von dem Vektor pRC/CMV-eGFP transkribiert. Die Plasmide, die Enzyme zur Linearisierung, die Transkriptionspolymerase und die Länge der Transkripte können der Tabelle 3.1.3 entnommen werden.

**Tabelle 3.1.3:** Der Name der Plasmide, die Enzyme zur Linearisierung, die Transkriptionspolymerase und die Länge der Transkripte der *in vitro* transkribierten RNS-Anti-Sense-Sonden.

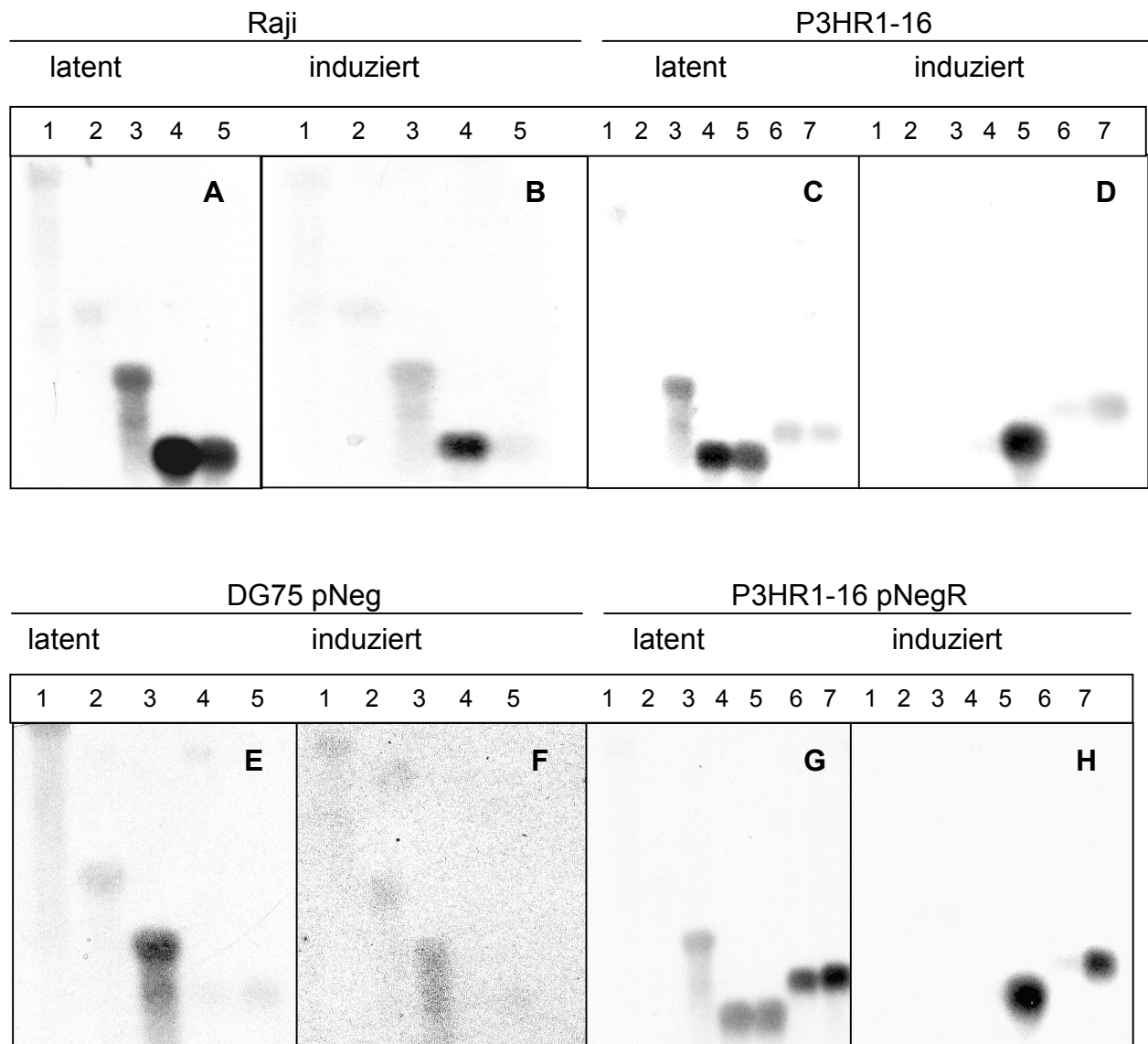
| Plasmid             | Enzym zur Linearisierung | Transkriptionspolymerase | Länge des Transkripts |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------|
| pCRII gβ-Aktin      | Spe I                    | T7                       | 2066 B                |
| pCRII tRNA Serin    | BamH I                   | T7                       | 512 B                 |
| pRC/CMV-eGFP        | Hind III                 | Sp6                      | 823 B                 |
| pCR 2.1 EBER-1      | Spe I                    | T7                       | 290 B                 |
| pCR 2.1 EBER-2      | Spe I                    | T7                       | 290 B                 |
| pCRII EBER-1-tag(S) | Not I                    | Sp6                      | 370 B                 |
| pCRII EBER-2-tag(S) | Not I                    | Sp6                      | 379 B                 |

Diese *in vitro* transkribierten RNS-Sonden (siehe Kapitel 2.4.5) wurden im *Northern-Blot*-Verfahren (siehe Kapitel 2.4.3) auf Membranen immobilisiert. Die Abbildung 3.1.3.1 zeigt ein Beispiel für die immobilisierten, Methylenblau gefärbten Anti-Sense-RNS-Sonden.



**Abbildung 3.1.3A: Kontrolle der AS-Sonden für die Nuclear Run On-Experimente.** Die Plasmide mit den jeweiligen Sequenzen wurden linearisiert und entsprechende Anti-sense-(AS)-RNS transkribiert. Je 1 µg der Sonden wurde im *Northern Blot*-Verfahren auf Membranen immobilisiert und mit UV-Strahlung fixiert. Die RNS wurde zur Kontrolle mit Methylenblau sichtbar gemacht.  
 1: RNS-Standard  
 1: AS-gβ-Aktin  
 2: AS-eGFP  
 3: AS-gtRNS Serin  
 4: AS-EBER-1  
 5: AS-EBER-1-tag(S)  
 6: AS-EBER-2  
 7: AS-EBER-2-tag(S)

Die Transkriptionsaktivität der Gene EBER-1 und EBER-2 in Raji-Zellen, P3HR1-16-Zellen und DG 75-Zellen mit pNeg (EBER-Expressionsplasmid) transfiziert, sowie der Reporter für EBER-1 und EBER-2 in P3HR1-16 Zellen mit pNegR (EBER-Reporter-Expressionsplasmid) transfizierte wurde mit *Nuclear Run On*-Experimenten (siehe Kapitel 2.3.6) überprüft (Abbildung 3.1.3.2: A bis H).



**Abbildung 3.1.3B: Aktive Transkription von EBER-2, nicht von EBER-1, und deren Reporter in produktiv infizierten Zellen.** Aus je  $1 \times 10^7$  Zellen wurden die Kerne präpariert und im *Run On* eine Momentaufnahme der Genaktivität mit radioaktiv markierter RNS hergestellt. Die *Run On*-RNS wurde an die immobilisierten *Anti-Sense*-RNS-Sonden hybridisiert, stringent gewaschen und mit Autoradiographie sichtbar gemacht.

1: g $\beta$ -Aktin; 2: eGFP; 3: gtRNS Serin; 4: EBER-1; 5: EBER-2; 6: EBER-1-tag(S); 7: EBER-2-tag(S).

A und B sind *Run On*-Experimente der Zelllinie Raji, C und D der Zelllinie P3HR1-16, E und F mit pNeg (EBER-Expressionsplasmid) transfizierter DG75-Zellen und G und H mit pNegR (EBER-Reporter-Expressionsplasmid) transfizierter P3HR1-16-Zellen.

A, C, E, G sind jeweils *run on*-Experimente mit Zellen im latenten Zustand; in den Experimenten B, D, F, H wurde die lytische Replikation mit TPA/BS/TGF- $\beta$  für 72 Stunden induziert.

Durch die hohe Hybridisierungstemperatur von 72 °C, die für die spezifische Hybridisierung der EBER-Reporter (jeweils Spur 6 und 7) nur an ihre dafür vorgesehenen (AS-)Reporter-Sonden nötig war, konnten in demselben Experiment nur sehr geringe Signale bei den restlichen Sonden (nicht gezeigt) erzielt werden. Weitere Sonden für den Nachweis von Latenz und viraler Replikation von EBV mussten somit ausgeklammert werden. Aus dem selben Grund waren die Signale für  $\beta$ -Aktin und eGFP (jeweils Spur 1 und 2) nur in den seltensten Fällen zu erkennen. Als einziges Signal ist das der Polymerase III-Kontrolle tRNS Serin (jeweils Spur 3) gut zu erkennen.

Die Hybridisierung an die (AS-)EBER-Reporter-Sonden war ausreichend spezifisch (siehe C und D; Spuren 6 und 7), da in den *Nuclear Run On*-Experimenten mit nicht transfizierten P3HR1-16-Zellen an den Sonden für die EBER-Reporter nur sehr schwache Signale zu erkennen waren. Die Transkription in EBV-positiven Zellen war mit der Transkription der original EBER-Transkripte vergleichbar (siehe G und H; Spuren 4, 5 und 6, 7). In EBV-negativen Zellen waren die Signale der EBERs trotz Aufreinigung der transfizierten Zellen (siehe Abschnitt 3.1.2) sehr schwach (siehe E und F; Spuren 4 und 5).

Die Reporter für die EBER-Transkripte reagierten bei Induktion der lytischen Replikation wie die Originale (siehe G und H; Spuren 4, 5 und 6, 7). Die Expression des Gens EBER-1 wurde beim Übergang von der Latenz in die virale Replikation stark abgesenkt. Diese Beobachtung konnte auch für den Reporter von EBER-1 gemacht werden. Sowohl EBER-2 als auch der EBER-2-Reporter hingegen wurden weiter exprimiert.

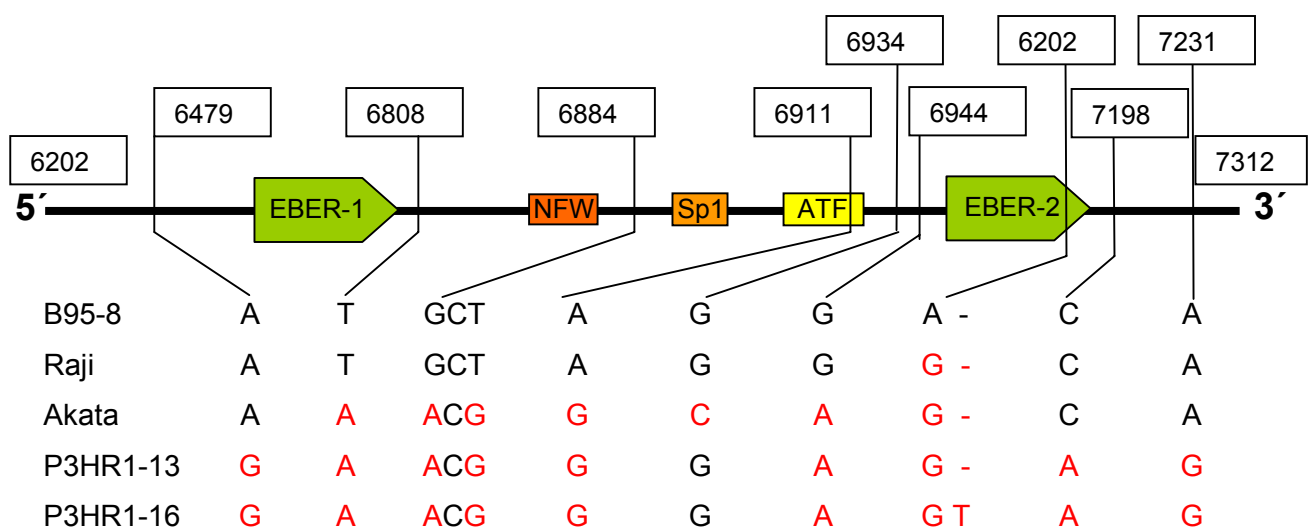
Vergleich man nun die Signale der EBER-Transkripte (siehe C,D,G und H; Spur 4 und 5) mit den Signalen der tRNS Serin (siehe C,D,G und H; Spur 3), so konnte eine Übereinstimmung der Expression von tRNS Serin mit der Expression von EBER-1 festgestellt werden. Daraus folgte, dass die Regulation von EBER-1 der natürlichen Regulation von Polymerase III-Transkripten folgte. Die Transkription beider Gene wurde fast vollständig abgeschaltet. Im Vergleich hierzu wurde das EBER-2-Gen und dessen Reporter weiter transkribiert.

In der Zelllinie P3HR1-16 (C und D; Spur 4 und 5) kehrte sich dadurch das Verhältnis der Transkription bei Induktion zwischen EBER-1 und EBER-2 um. Im Gegensatz dazu blieb das Verhältnis (A und B; Spur 4 und 5) in der Zelllinie Raji, bei der die lytische Phase vor der Virusreplikation stoppt, gleich. Die Ursachen für die unterschiedliche Regulation in den Zelllinien (Nukleotidsequenz, zelluläre Faktoren, virale Faktoren) werden in den nachfolgenden Kapiteln behandelt.

### 3.2 Analysen der Promotoren vor EBER-1 und EBER-2

#### 3.2.1 Sequenzierung der EBER-Gene der EBV-Stämme von Akata, P3HR1-13 und -16, B95-8 und Raji zeigten wenige Mutationen

Die unterschiedliche Aktivität von EBER-1 und EBER-2 zwischen den Zelllinien Raji und B95-8 und anderen Zelllinien wie z.B. P3HR1 (bei dem Übergang von der Latenz in die produktive Virusvermehrung) konnte möglicherweise Nukleotidunterschiede in regulatorischen Elementen im Promotor der EBER-Gene betreffen. Aus diesem Grund wurden die Promotoren beider EBER-Gene auf Nukleotidebene miteinander verglichen. Hierzu wurde die genomische Sequenz mit PCR (siehe Kapitel 2.4.8.1; *Expand High Fidelity*) amplifiziert, in den Vektor pLitmus 28 kloniert und mit den Sequenzieroligos S1 und S2 (siehe Kapitel 2.2.1 und 2.2.2) sequenziert. Die Sequenzvergleiche sind in Abbildung 3.2.1 zusammengefaßt (siehe auch Anhang 1).



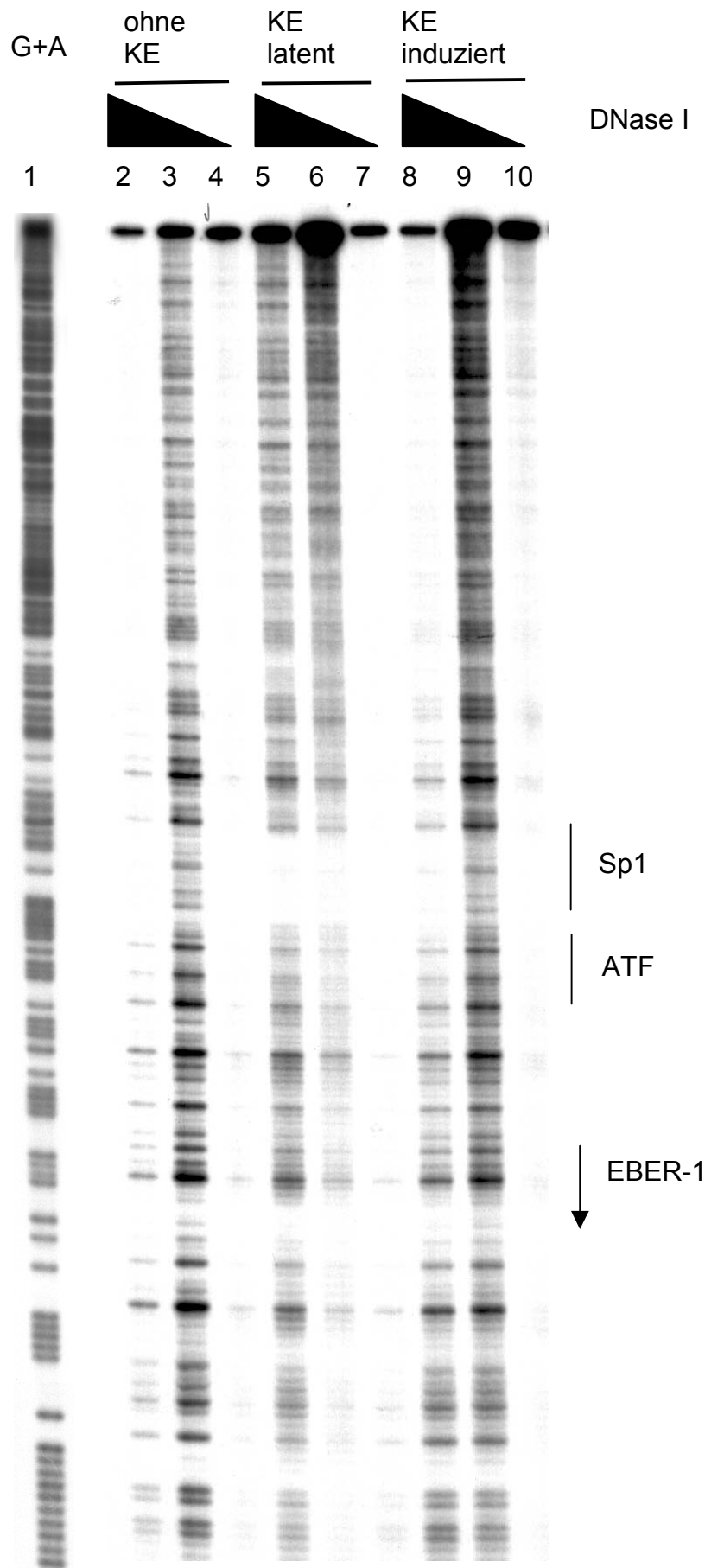
**Abbildung 3.2.1: Vergleich der Promotor-Nukleotidsequenzen der EBER-Gene in unterschiedlichen Virusstämmen.** Aus je  $1 \times 10^7$  Zellen wurde die genomische DNS präpariert und der Bereich des EBV-Genoms, der die EBER-Gene enthielt, mittels PCR isoliert. Die Sequenzierung mit S1- und S2-Primer wurde mit dem Computerprogramm Seqman mit der Standardsequenz von B95-8 verglichen. Die Basenaustausche sind oben in rot markiert.

Der Bereich der EBER-Gene zeigte nur wenige Sequenzunterschiede. Die meisten dieser Unterschiede lagen nicht in Bereichen von bekannten funktionalen Elementen. Es war aber nicht auszuschließen, dass durch Sekundärstrukturen Einfluss auf die Transkription genommen wird. Der einzige Nukleotidunterschied in dem Bereich eines Transkriptionsfaktors lag vor EBER-2 in der Bindesequenz für die Transkriptionsfaktorfamilie ATF. Hier ist bei Akata-, P3HR1-13- und P3HR1-16-Virus im Vergleich zu Raji- und B95-8-Virus die Sequenz von TGACGTAG zu TGACGTGG verändert. Passender weise wurde auch in den Zellen Akata-, P3HR1-13 und P3HR1-16 eine Regulation nachgewiesen, die sich von der Regulation in B95-8- und Raji-Zellen unterschied. Die Auswirkungen dieser Sequenzunterschiede auf die Bindung des Transkriptionsfaktors ATF ist nachfolgend in Abschnitt 3.2.4 dargestellt.

### **3.2.2 DNase I *Footprint* – Analysen ergaben keine Protein-Bindestellen, die die Regulation der EBER-Gene erklären konnten**

Ausgehend von der Annahme, dass beim Übergang von der Latenz in die replikative Phase im Promotor von EBER-1 oder EBER-2 unterschiedliche Transkriptionsfaktoren binden könnten, sollten mit *Footprint*- Analysen die regulatorischen Bereiche in beiden Phasen miteinander verglichen werden.

10 µg des Vektors pLit EGR(S) plus wurden mit *EcoR* I linearisiert, an den Enden radioaktiv markiert und die eine Hälfte mit *Spe* I und die andere Hälfte mit *Hind* III nachgeschnitten. Die so erhaltenen, an einem Ende markierten Fragmente wurden mit Kernextrakt (siehe Kapitel 2.3.7) aus latenten und für 72 Stunden mit TPA/BS/TGF-β induzierten P3HR1-16-Zellen inkubiert, mit DNase I verdaut und analysiert (siehe Kapitel 2.4.11). Beispielhaft für die Ergebnisse des *in vitro* DNase I *Footprint* ist in Abbildung 3.2.2 der *Footprint* des EBER-1-Fragments (6207-6716: Koordinaten des B95-8-Stamms) dargestellt.



**Abbildung 3.2.2: DNase I *in vitro* Footprint-Experimente** ergaben keine Unterschiede in den Bindemustern von Transkriptionsfaktoren in der Latenz und in der produktiven Phase, die die Unterschiede der Regulation erklären konnten. 10 µg des Vektors pLit EGR(S) plus wurden mit *Eco* R I gespalten. Die überstehenden Enden wurden mit Klenow-Polymerase mit einem Nukleotidmix mit  $P^{32}$ - $\alpha$ -dATP aufgefüllt. Das so an beiden Enden markierte DNS-Fragment wurde mit *Spe* I nachgeschnitten, mit 20 µg Kernextrakt (KE) inkubiert und mit DNase I verdaut. Die aufgereinigten Proben wurden zusammen mit einer G+A-Sequenzierspur auf einem 8 %-igem Harnstoff-polyacrylamid-Gel aufgetrennt und detektiert.

1: G+A Sequenzierung;

2, 3, 4: Spuren ohne Kernextrakt;

5, 6, 7: Spuren mit latentem P3HR1-16-KE;

8, 9, 10: Spuren mit induziertem P3HR1-16-KE.

Die Stellen des DNS-Fragments, an die Transkriptionsfaktoren gebunden haben, sind im Bandenmuster als helle Stellen im Vergleich zur Spur ohne KE zu sehen.



In der G+A-Sequenzierspur (Spur 1) wurden die Nucleotidbindungen des DNS-Fragments, statistisch verteilt, nach jedem Purin-Nukleotid chemisch gebrochen. Dadurch entsteht ein Leitmuster, das Fragmente mit jeweils einem GTP oder ATP am Ende zeigte. Diese Spur wurde zu Orientierung verwendet. Da der *in vitro* DNase I *Footprint* eine vergleichende Methode ist, mussten zu den Ansätzen mit Kernextrakt auch Ansätze ohne Kernextrakt verwendet werden. In diesen Ansätzen wurde das Kernextrakt durch BSA ersetzt. Da in den Kernextrakten auch DNasen enthalten sein konnten, mussten jeweils mehrere Ansätze mit unterschiedlicher DNase I -Konzentration untersucht werden. In Spur 4, 7 und 10 ist die DNase I -Konzentration zu gering, d.h. es waren nur wenige, lange DNS-Fragmente zu sehen. In den Spuren 2 und 8 hingegen war die DNase I -Konzentration zu hoch. In diesen Spuren waren nur noch sehr kleine Fragmente zu erkennen. In Spur 3, 5, 6 und 9 war die DNase I -Konzentration so abgestimmt, dass die DNS-Fragmente statistische verteilt waren.

Ein *Footprint* zeichnete sich dadurch aus, dass an dieser Stelle die DNS durch einen Transkriptionsfaktor geschützt war und die DNase I hier nicht schneiden konnte. Vergleich man Spur 5 und 6 (mit latentem Kernextrakt inkubiert) mit Spur 3 (Reverenz ohne Kernextrakt), so erkannte man an einer Stelle einem weißen Bereich der in der Reverenzspur mit Banden gefüllt war. Dies war die Stelle, an der der Transkriptionsfaktor Sp1 die DNS vor dem Verdau mit DNase I geschützt hatte. Auch in Spur 8 und 9 (mit induziertem Kernextrakt inkubiert) war diese Stelle zu erkennen. Die Protektion war aber nicht so stark, wie bei den Spuren 5 und 6, so dass die Intensität der Banden nur etwas reduziert war. Die *Footprint*-Experimente des Promotor-Bereichs von EBER-2 waren entsprechend der von EBER-1. Auch hier konnte nur Sp1 eindeutig nachgewiesen werden. Da sie weiter keine Aussage erlaubten, sind sie hier nicht dargestellt.

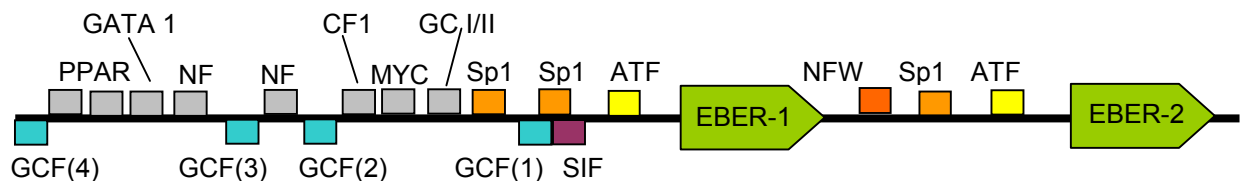
Der Nachweis von ATF konnte in beiden Promotoren nicht eindeutig geführt werden, da die *in vitro*-Bindung des Faktors unter den gegebenen Bedingungen zu schwach war.

Die *footprint*-Analysen zeigten außer den bekannten Bindestellen für ATF und Sp1 keine weiteren. Der Unterschied zwischen latentem und induziertem KE lag in der Intensität des *footprints*.

### 3.2.3 Theoretische NFW- und GCF- Bindestellen in den Promotorbereichen der EBER-Gene

Da durch die *footprint*-Experimente keine Unterschiede in den Bindungsmustern der Transkriptionsfaktoren beim Übergang von der Latenz in die lytische Phase an den Promotoren

von EBER-1 und EBER-2 zu erkennen waren, wurden die Promotoren einer Computeranalyse unterzogen. Hierzu wurden die Promotor-Sequenzen der EBER-Gene der Transfac-Datenbank in Braunschweig (<http://transfac.gbf.de>) geschickt und folgende in Abbildung 3.2.3 zusammengefasste theoretische Bindestellen gefunden.



**Abbildung 3.2.3: Zusammenstellung der theoretischen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren im Promotorbereich von EBER-1 und EBER-2.** Es ist der Promotorbereich von EBER-1 und EBER-2 dargestellt. Die Bindestellen für Transkriptionsfaktoren sind durch eine Computeranalyse erstellt.

In den *Nuclear Run On*-Experimenten (siehe Kapitel 3.1.3) wurde gezeigt, dass EBER-1 beim Übergang von EBV von der Latenz in die virale Replikation abgeschaltet und EBER-2 weitertranskribiert wird. Da von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde, dass keine weiteren Aktivatoren vor EBER-1 in der Latenz für eine 100 %-ige Expression des Gens nötig sind, sollte demnach nach einem Repressor im Promotor von EBER-1 oder einem Aktivator im Promotor von EBER-2 gesucht werden, der im Stadium der viralen Replikation aktiviert wird. Alle in Abbildung 3.2.3 grau eingezeichneten Faktoren im Promotorbereich von EBER-1 sind Aktivatoren. Da außer für ATF und Sp1 für keinen der oben dargestellten Faktoren ein Einfluss auf die EBER-Transkription bekannt ist und SIF und GCF(1) für EMSA-Experimente durch die Überlappung mit jeweils zwei weiteren Faktoren einen höheren experimentellen Aufwand und mehr Zeit beansprucht hätten, wurden zunächst NFW als möglicher Aktivator vor EBER-2 und GCF(2) als möglicher Repressor im Promotor von EBER-1 ausgewählt.

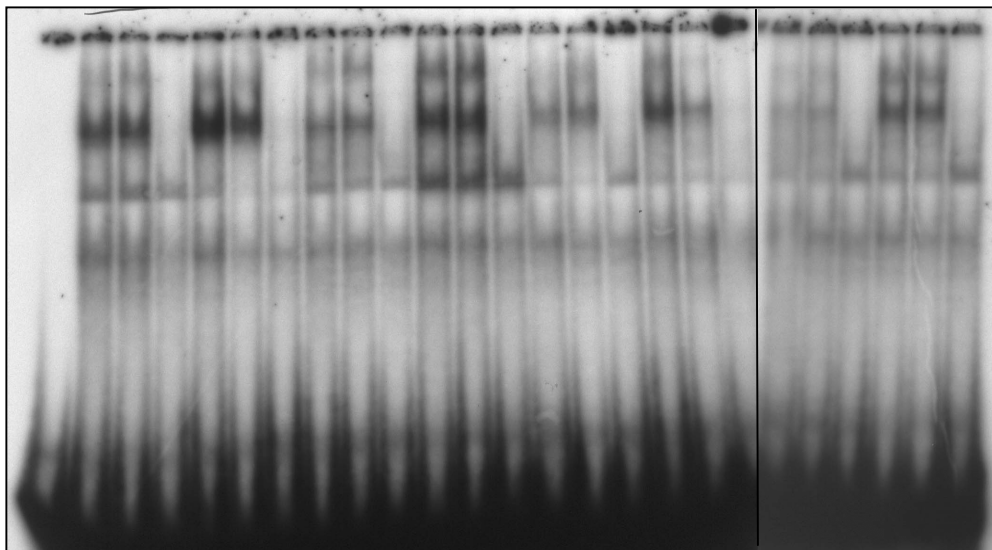
### 3.2.4 Identifizierung von NFW als Transkriptionsfaktor im Promotor von EBER-2 durch EMSA-Experimente bestätigt

Aus den theoretischen Bindestellen wurden die Sequenzen für die Transkriptionsfaktoren NFW und GCF und die schon bekannten Bindestellen für Sp1 und ATF (Sequenz aus P3HR1-16 und B95-8; siehe auch 3.2.1) ausgewählt und mittels EMSA untersucht. Die Oligos wurden nach Kapitel 2.4.8 mit  $P^{32}$  markiert und mit Kernextrakten (siehe Kapitel 2.4.13) von latent infizierten

Zellen und mit Kernextrakten aus induzierten DG75-, P3HR1-16-, B95-8- und Raji-Zellen (24 Stunden mit TPA/BS/TGF- $\beta$  behandelt) inkubiert und nach Kapitel 2.4.12 analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2.4 zusammengestellt.

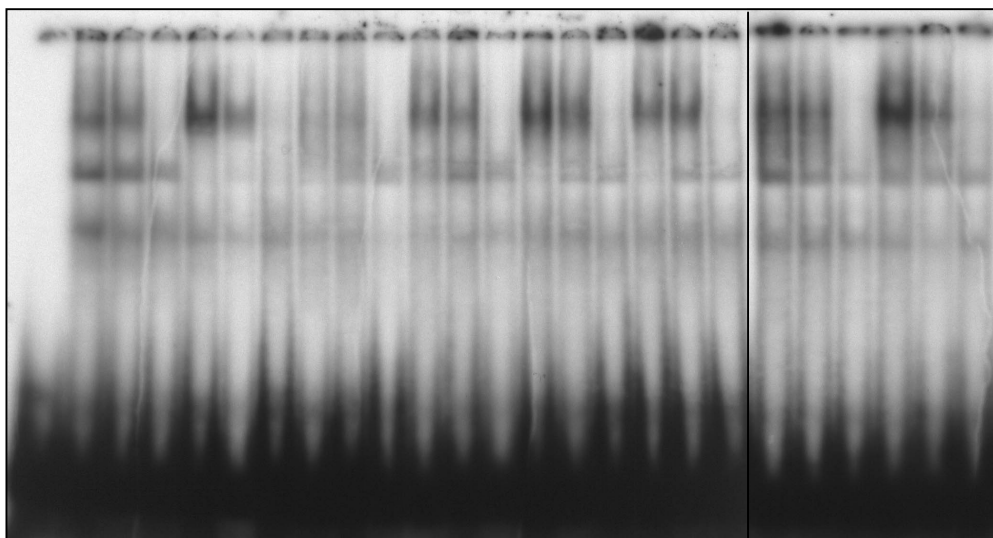
#### ATF-Bindestelle aus B95-8

| DG75                |   |   |   |   |   |   | P3HR1-16            |   |    |    |    |    | B95-8               |    |    |    |    |    | Raji                |    |    |    |    |    |
|---------------------|---|---|---|---|---|---|---------------------|---|----|----|----|----|---------------------|----|----|----|----|----|---------------------|----|----|----|----|----|
| TPA/BS/TGF- $\beta$ |   |   |   |   |   |   | TPA/BS/TGF- $\beta$ |   |    |    |    |    | TPA/BS/TGF- $\beta$ |    |    |    |    |    | TPA/BS/TGF- $\beta$ |    |    |    |    |    |
| -                   | - | - | + | + | + | - | -                   | - | +  | +  | +  | -  | -                   | -  | +  | +  | +  | -  | -                   | -  | +  | +  | +  |    |
| 1                   | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8                   | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14                  | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20                  | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 |

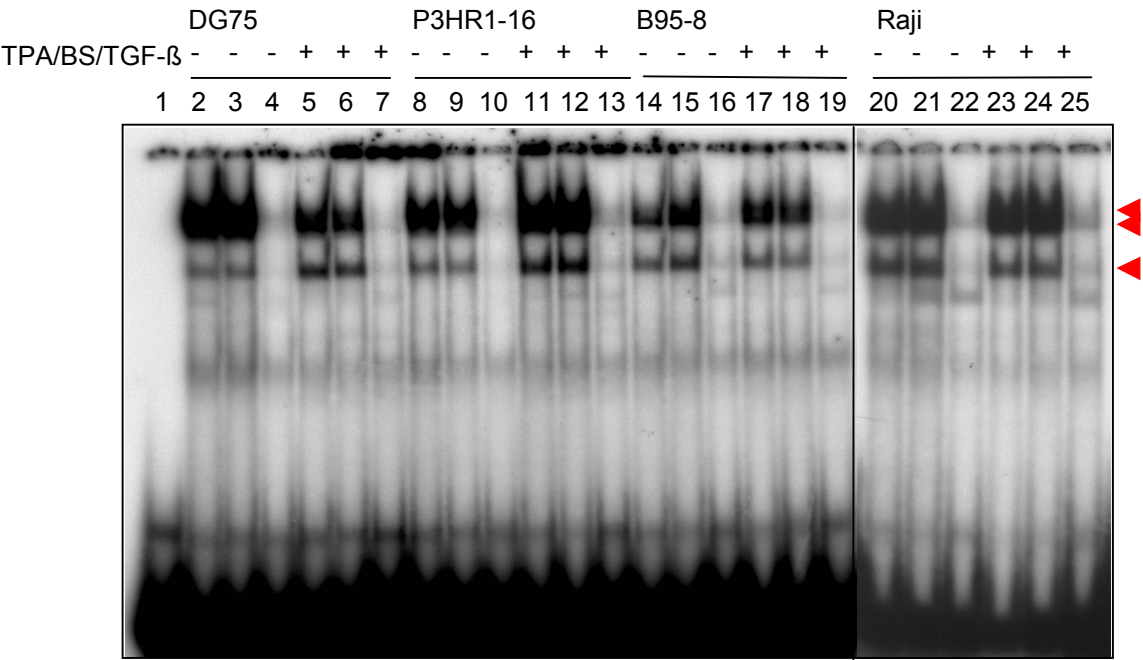


#### ATF-Bindestelle aus P3HR1-16

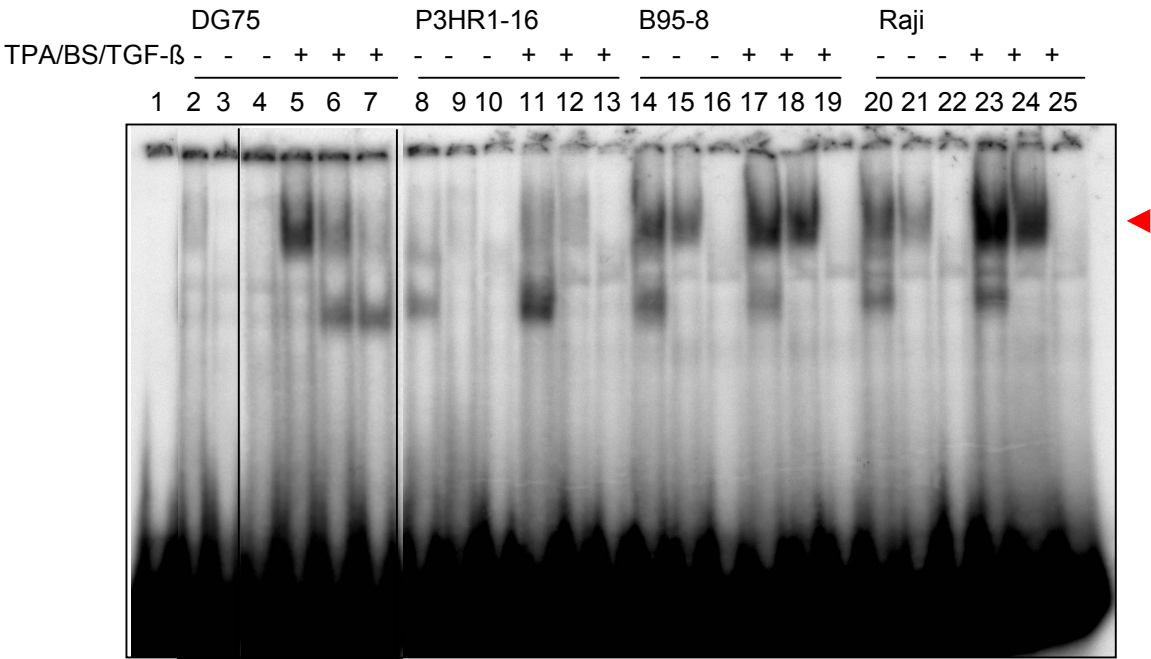
| DG75                |   |   |   |   |   |   | P3HR1-16            |   |    |    |    |    | B95-8               |    |    |    |    |    | Raji                |    |    |    |    |    |
|---------------------|---|---|---|---|---|---|---------------------|---|----|----|----|----|---------------------|----|----|----|----|----|---------------------|----|----|----|----|----|
| TPA/BS/TGF- $\beta$ |   |   |   |   |   |   | TPA/BS/TGF- $\beta$ |   |    |    |    |    | TPA/BS/TGF- $\beta$ |    |    |    |    |    | TPA/BS/TGF- $\beta$ |    |    |    |    |    |
| -                   | - | - | + | + | + | - | -                   | - | +  | +  | +  | -  | -                   | -  | +  | +  | +  | -  | -                   | -  | +  | +  | +  |    |
| 1                   | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8                   | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14                  | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20                  | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 |

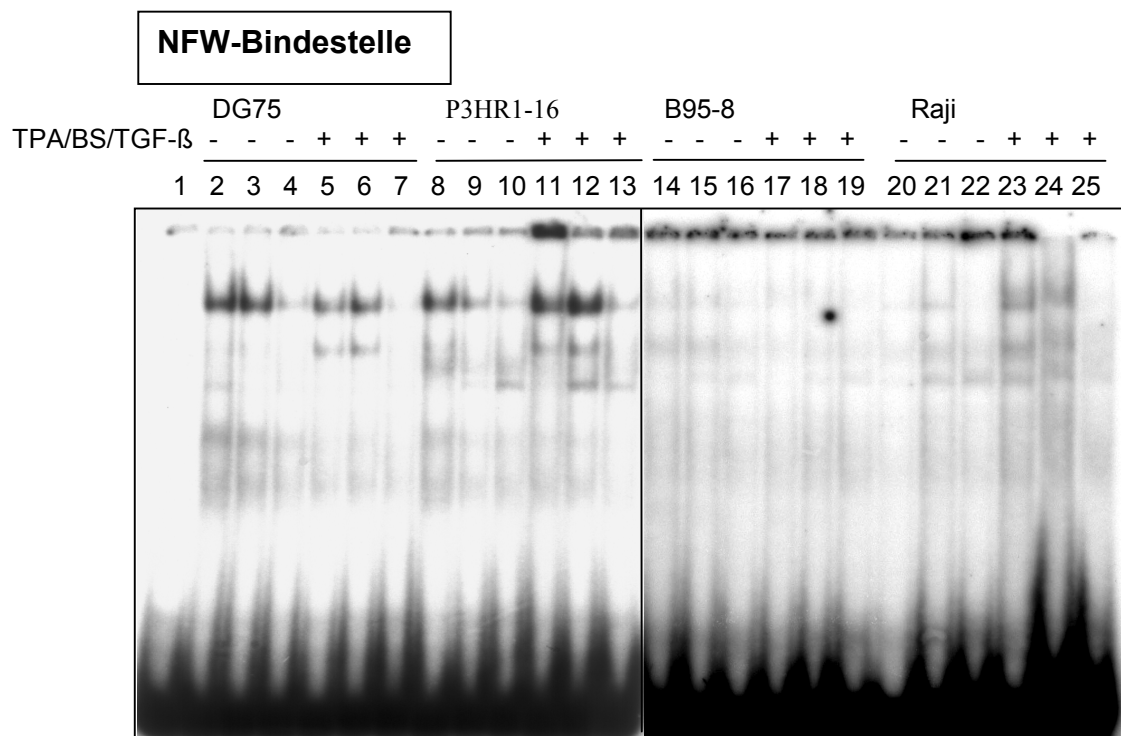
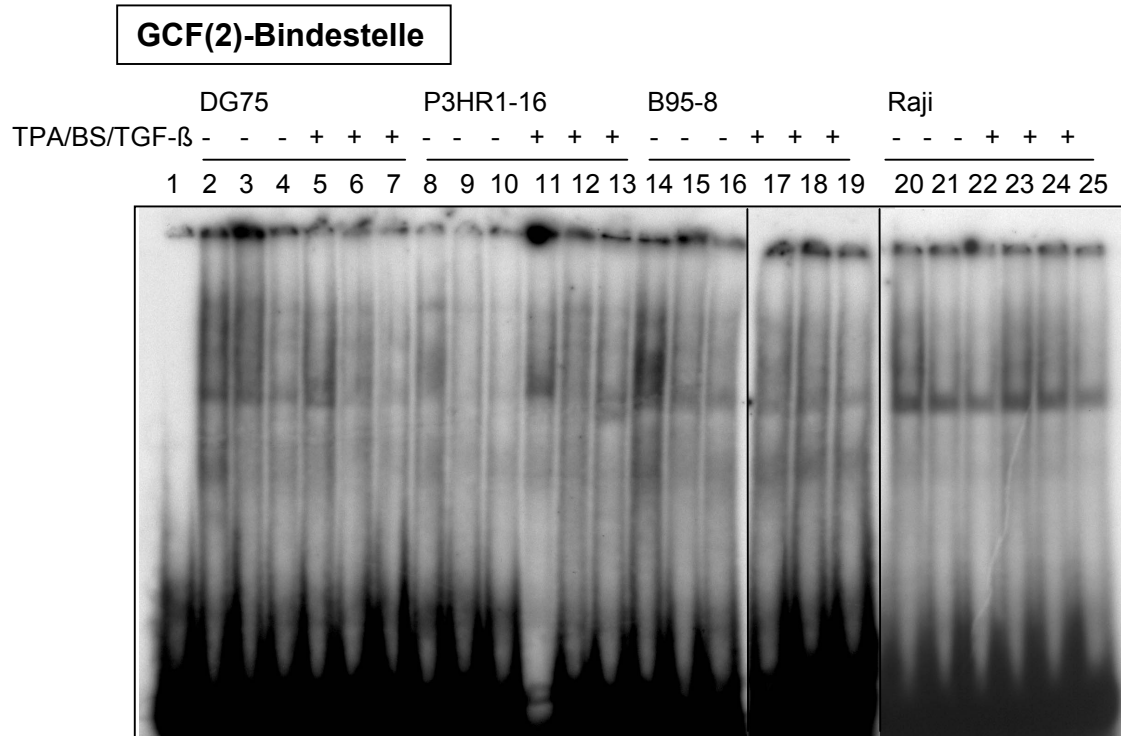


Sp-1-Bindestelle



NF $\kappa$ B-Bindestelle





**Abbildung 3.2.4: Bestätigung con NFW als neuer Faktor im Promotorbereich von EBER-2.** Zwei komplementäre Oligos mit der Bindestelle der jeweiligen Faktoren wurden hybridisiert und mit  $\gamma$ -P<sup>32</sup>-ATP endmarkiert. Diese markierten Oligos wurden im geeigneten Puffer mit Kernextrakt aus latenten und induzierten Zellen inkubiert und in einem TBE/Polyacrylamidgel aufgetrennt. Spur 1 ist jeweils das Oligo ohne Kernextrakt; Spur 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20 und 23 ist jeweils das Signal ohne Konkurrenz; Spur 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 und 24 ist jeweils mit 66 x unspezifischen Kompetitor inkubiert (bei ATF: NFW; bei Sp1: Sp1 mutiert; bei NF $\kappa$ B: NF $\kappa$ B mutiert; bei GCF: GCF mutiert; bei NFW: ATF); Spur 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22 und 25 ist jeweils mit 66 x spezifischen Kompetitor inkubiert (jeweils das gleiche Oligo, das in den EMSA eingesetzt wurde, nur ohne Markierung).

### **ATF-Bindestelle**

Der Sequenzunterschied in der Bindestelle für ATF von TGACGTAG aus B95-8 zu TGACGTGG in P3HR1-16 erzeugte unterschiedliche Bindemuster (Tafel ATF aus B95-8 und ATF aus P3HR1-16 jeweils rote Pfeile). An die ATF-Bindestelle aus B95-8-Virus banden zwei Faktoren an die DNS (z.B. Spur 8 und 9 in Tafel ATF-Bindestelle aus B95-8), bei der ATF-Bindestelle aus P3HR1-16-Virus nur ein Faktor (z.B. Spur 14 und 15 in Tafel ATF-Bindestelle aus P3HR1-16). Die Intensität der Signale war in den unterschiedlichen Kernextrakten unterschiedlich stark (z.B. Spur 2 und 3 in Tafel ATF-Bindestelle aus B95-8 und Spur 2 und 3 in Tafel ATF-Bindestelle aus P3HR1-16). Die Signalstärke nahm nach Induktion der viralen Replikation sowohl an der Bindestelle für ATF aus B95-8-Virus (z.B. Spur 2, 3 und 5, 6 in Tafel ATF-Bindestelle aus B95-8) als auch für ATF aus P3HR1-16 (z.B. Spur 2, 3 und 5, 6 in Tafel ATF-Bindestelle aus P3HR1-16) zu, d.h. es waren größere Menge an ATF-Faktoren im Kernextrakt.

### **Sp1-Bindestelle**

Die Bindestelle für Sp1 lieferte *in vitro* sehr starke Signale von mindestens drei Faktoren (Tafel Sp1-Bindestelle jeweils rote Pfeile), die mit allen Kernextrakten zu beobachten waren. Die Intensität der untersten Bande nahm nach Induktion bei Kernextrakten aus DG75- und P3HR1-16- Zellen zu (Spur 2 und 8 verglichen mit Spur 5 und 11 auf Tafel Sp1-Bindestelle). Bei den Kernextrakten aus B95-8- und Raji-Zellen blieb sie gleich (Spur 14 und 20 verglichen mit Spur 17 und 23 auf Tafel Sp1-Bindestelle). Die oberen zwei Banden verhielten sich unterschiedlich: In DG75-Extrakten wurden die Banden schwächer (Tafel Sp1-Bindestelle, Spuren 3 und 6), in P3HR1-16-Extrakten wurden die Banden stärker (Tafel Sp1-Bindestelle, Spuren 9 und 12) und in den B95-8- und Raji-Extrakten blieben sie gleich (Tafel Sp1-Bindestelle, Spuren 15, 21 und 18, 24).

### **NFκB-Bindestelle**

NFκB wird nach Inkubation von Zellen mit TPA durch Abspaltung eines Inhibitors IκB aktiviert und aus dem Zytoplasma in den Kern transportiert. Die Inkubation von Zellen mit TPA bewirkt bei EBV den Übergang von der Latenz in die produktive Virusvermehrung. Durch Nachweis von bindungsaktiven NFκB in den Kernextrakten mittels EMSA konnte die Wirkung des TPA auf die Zellen nachgewiesen und damit indirekt Rückschlüsse auf die Induktion des EBV gezogen werden. Es zeigt sich, dass in allen Zelllinien NFκB induziert wurde (Tafel NFκB Spuren 5, 11, 17 und 23), wobei die Induktion in P3HR1-16-Zellen hier nach 24 Stunden nicht effektiv war

(Spur 9 verglichen mit Spur12). Bei der Zelllinie B95-8 konnte NFκB auch ohne Induktion nachgewiesen werden (Tafel NFκB-Bindestelle, Spur 14 und 15). Bei dieser Zelllinie geht immer ein gewisser Teil der Zellen (ca. 5 %) spontan in die lytische Phase über. Auch bei der Zelllinie Raji war in latentem Status der Nachweis von NFκB möglich (Tafel NFκB Spur 20 und 21). Ob die Aktivierung von NFκB möglicherweise direkt als Marker für die Permissivität von EBV-positiven Zellen benutzen könnte, kann aus diesen Experimenten jedoch nicht eindeutig geschlossen werden.

### **GCF(2)-Bindestelle**

An der Bindestelle für GCF(2) konnte *in vitro* weder in Extrakten von latenten, noch von induzierten Zellen ein Bindungsfaktor nachgewiesen werden (Tafel GCF-Bindestelle alle Spuren).

### **NFW-Bindestelle**

Bei der NFW-Bindestelle zeigte sich bei den Kernextrakten aus DG75- und P3HR1-16-Zellen sowohl ein genereller Faktor der in latenten Extrakten, als auch in Kernextrakten von induzierten Zellen, zu finden war (Tafel NFW-Bindestelle z.B. Spuren 2 und 8, oberer Komplex). Ein zusätzlicher Faktor erschien nach der Induktion der Zellen (Tafel NFW-Bindestelle z.B. Spuren 5 und 11, unterer Komplex). Beide Faktoren waren in der Zelllinie B95-8 und Raji nicht zu finden (Tafel NFW-Bindestelle z.B. Spuren 15 und 21). Da die Ergebnisse von DG75 und P3HR1-16 auf einem anderen Film entwickelt wurden wie die Ergebnisse von B95-8 und Raji, d.h. die Siganle auch durch zwei unterschiedliche *Scann*-Vorgänge digitalisiert wurden, sind in dem Teil von B95-8 und Raji Banden zu erkennen (Tafel NFW-Bindestelle Spuren 24 und 25), die im Original kaum zu sehen sind. Diese Abweichung vom Original war *Software*-bedingt und konnte nicht beeinflusst werden. Bei den Virusstämmen in den Zelllinien B95-8 und Raji nahm die Expression beider EBER-Transkripte nach Induktion gleichmäßig ab. Im Gegensatz dazu wurde in der Zelllinie P3HR1-16 EBER-2 nach Induktion aktiv weiter transkribiert. Diese Transkriptionsdaten passten zu der Beobachtung, dass in B95-8- und Raji-Kernextrakten kein NFW-Faktor vorhanden war, wohl aber im P3HR1-16-Kernextrakt, d.h. NFW könnte an der Expression von EBER-2 in der Phase der Virusproduktion beteiligt sein.

In Kernextrakten aus latent infizierten Zellen waren Faktoren enthalten, die an die Sp1-, ATF- und NFW-Bindestelle binden konnten. Die Extrakte enthielten keine Faktoren für die GCF(2)-Bindestelle. Nach Induktion der Zellen konnte in den Kernextrakten noch ein zusätzlicher Faktor

an der NFW-Bindestelle nachgewiesen werden. Die Sequenzunterschiede der ATF-Bindestelle vor EBER-2 in den Virusstämmen P2HR1-13, -16 und Akata im Gegensatz zu B95-8 und Raji führten zu unterschiedlichen Bindemustern der Faktoren.

Die Bindung von NFW-Faktoren in einem EBV-Promotor wurde zum erstenmal nachgewiesen. Für die differentielle Regulation der EBER-Gene könnte NFW eine Rolle spielen.



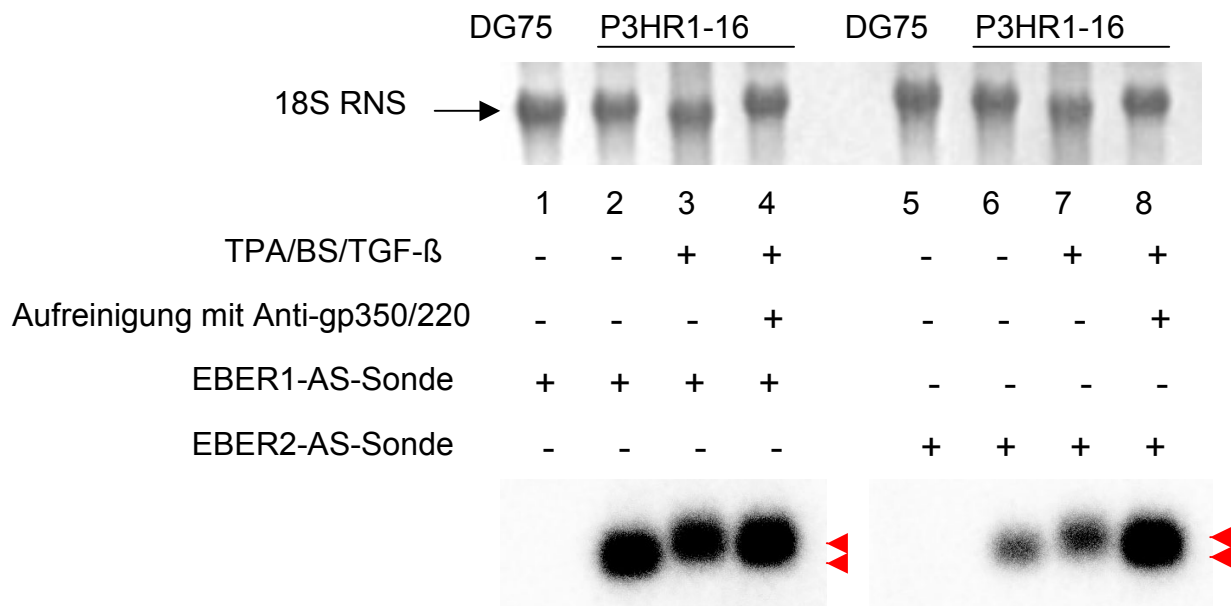
### **3.3 Analyse von Modifikationen der EBER-Transkripte, die deren Funktionalität beeinflussen könnten**

Mit *Nuclear Run On*-Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass sich die Transkriptionsaktivität der EBER-Promotoren beim Übergang von der Latenz in die lytische Replikation ändert: die Transkription von EBER-1 wird abgeschaltet, EBER-2 wird weiterhin transkribiert. Im *Northern Blot* ist aber kein Unterschied in der Menge der EBER-1 Transkripte festzustellen. Was den Sinn der transkriptionellen Regulation in Frage stellte. Ob zusätzliche Modifikationen die Funktionalität der Transkripte steuerten, sollte in diesem und im nächsten Kapitel behandelt werden.

#### **3.3.1 Northern Blotting zeigte unterschiedliches Laufverhalten der EBER-Transkripte während der Latenz und der produktiven Virusvermehrung**

Die EBER-Transkripte wurden im *Northern Blot*-Verfahren mit *Anti-Sense*-RNS-Sonden untersucht, um Unterschiede in deren Laufverhalten zu ermitteln, was auf mögliche Modifikationen hätte hinweisen können. Bei der Verwendung von *Anti-Sense*-RNS-Sonden konnten die Hybridisierungsbedingungen sehr stringent eingestellt werden, so dass die Spezifität des Nachweises gesteigert werden konnte. Entsprechende Nachweise mit DNS-Sonden waren nicht geeignet.

In Abbildung 3.3.1.1 sind die Ergebnisse mit *Anti-Sense*-RNS-Sonden dargestellt. Hierzu wurde die codierende Sequenz der EBERs mit PCR amplifiziert (siehe Kapitel 2.4.9.1) und in den pCR2.1-Vektor kloniert (siehe Kapitel 2.2.4). Mit Hilfe dieser Vektoren konnten durch *in vitro* Transkription (IVT) *Anti-Sense*-RNS-Sonden hergestellt werden (siehe Kapitel 2.4.5), die mit Digoxigenin markiert waren. Mit diesen Sonden wurden die Transkripte EBER-1 und EBER-2 von latent, replikativ und aufgereinigten replikativ infizierten P3HR1-16-Zellen (Induktion siehe Kapitel 2.3.1; Aufreinigung siehe Kapitel 2.3.4.1) untersucht (Abbildung 3.3.1.1).



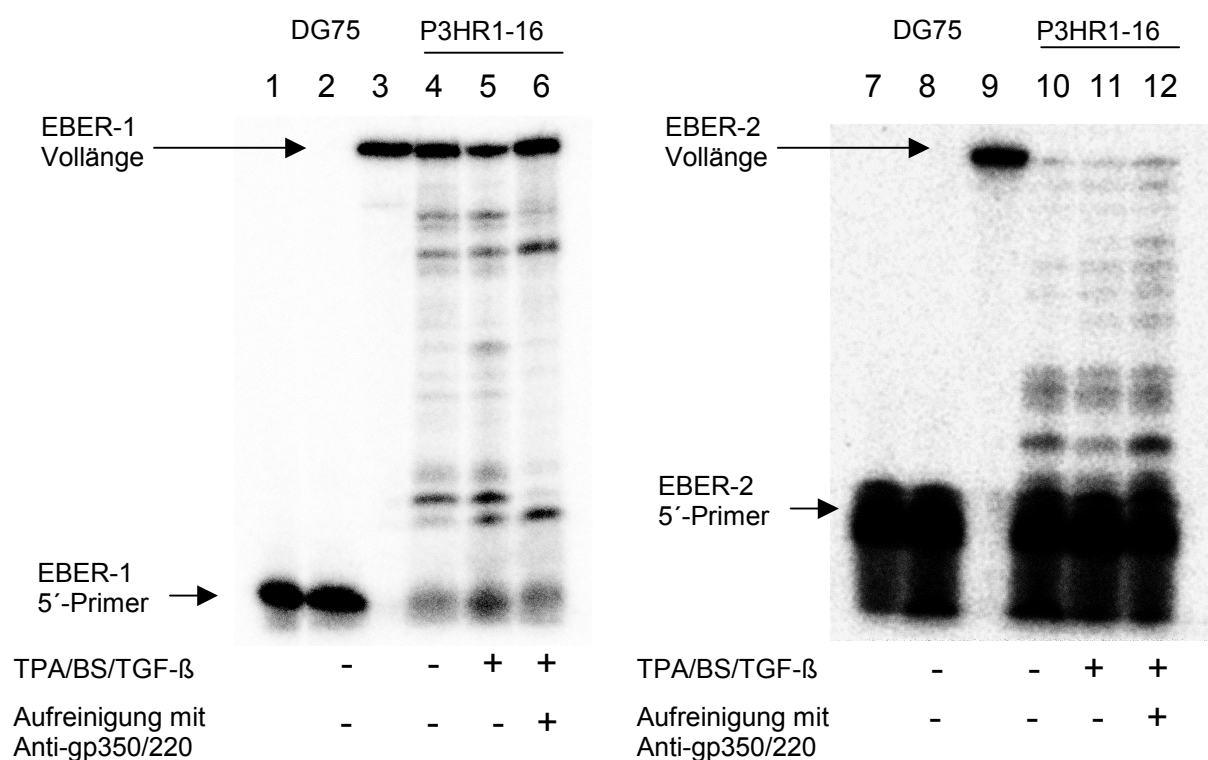
**Abbildung 3.3.1.1: Das Laufverhalten von latenten und lytischen EBER-Transkripten ist unterschiedlich.** Je 2  $\mu$ g RNS (DG75-RNS: Spur 1 und 5, P3HR1-16-RNS latent: Spur 2 und 6, induziert: Spur 3 und 7 und induziert aufgereinigt: Spur 4 und 8) wurden auf einem 1%-igem denaturierendem Formaldehyd-Gel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und an die Membran gekoppelt. Methylenblau-Färbung machte die RNS auf der Membran sichtbar. Durch Vergleich der 18S-RNA konnten gleiche Mengen und Güte der RNS bestimmt werden. Die Hybridisierung der EBER1/2-*Anti-sense*-RNS –Sonden erfolgte bei 65°C über Nacht. Nach stringentem Waschen wurde das Digoxigenin der markierten Sonden detektiert.

Die *Anti-Sense*-RNS-Sonden für EBER-1 und EBER-2 hybridisierten sehr stringent, da in den Spuren 1 und 5 keinerlei Hybridisierung mit RNS aus EBV negativen DG75-Zellen zu sehen war. Das Laufverhalten von latenten und lytischen EBER-Transkripten war unterschiedlich (Spur 2, 3 und 5, 6). Die Transkripte von EBER-1 und EBER-2 aus produktiv infizierten Zellen schienen so modifiziert, dass sie im *Northern Blot* langsamer liefen als die Transkripte aus latenten Zellen. Die Modifikation der EBER-Transkripte musste sehr effizient geschehen, da nach Induktion der produktiven Vermehrung des Virus nur noch die modifizierte RNS zu sehen war (Spur 3 und 7). Da bei chemischer Induktion nur bei ca. 30 % der Zellen virale Replikation nachzuweisen war, wurden die Zellen mit replizierendem EBV aufgereinigt, um eine einheitlich induzierte Population untersuchen zu können. Da eine Aufreinigung der Zellen mit replizierendem EBV keine Unterschiede (Spur 4 und 8) zu induzierten nicht aufgereinigten Zellen (Spuren 3 und 7) ergab, musste die Modifikation einen sehr frühen Vorgang darstellen, der auch in den Zellen stattgefunden hatte, in denen EBV noch nicht vollständig in die produktive Phase übergegangen war.

Nachfolgend sollte die Art einer möglichen Modifikation bestimmt werden.

### 3.3.2 *Primer Extension*-Experimente zeigten keine Unterschiede zwischen Latenz und viraler Replikation am 5'-Ende der EBER-Transkripte

Das 5'-Ende der EBER-Transkripte wurde mittels *Primer Extension*-Experimenten untersucht. Hierzu wurde RNS aus latenten, induzierten (siehe Kapitel 2.3.1) und induzierten, aufgereinigten (siehe Kapitel 2.3.4.1) P3HR1-16-Zellen und DG75-Zellen präpariert. Die 5'-Enden von EBER-1 und EBER-2 wurden durch eine reverse Transkriptions-PCR (*Primer Extension*) mit spezifischen 3'-Primern untersucht (siehe Kapitel 2.4.10). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3.2 zusammengefasst.



**Abbildung 3.3.2: *Primer Extension*-Experimente lieferten keine Unterschiede zwischen latenten Transkripten und Transkripten der produktiven Virusvermehrung.**  $1 \times 10^8$  P3HR1-16-Zellen wurden für 72 Stunden mit TPA/BS/TGF-β induziert und aus  $5 \times 10^7$  die Zellen mit Virusreplikation über einen Anti-gp350/220 Antikörper aufgereinigt. Aus latenten, induzierten und induzierten aufgereinigten P3HR1-16-Zellen und latenten DG75-Zellen wurde Gesamt-RNS präpariert. Je 10 µg der RNS wurde in die Reaktion mit  $\gamma$ - $P^{32}$ -ATP markierten EBER-1 3'- und EBER-2 3'-Primer eingesetzt und die RNS in DNS umgeschrieben. Der Ansatz wurde in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Signale durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Es ist jeweils der markierte 3'-Primer (Spur 1 und 7), die Negativkontrolle mit DG75 RNS (Spur 2 und 8), die zu erwartende Volllänge (Spur 3 und 9: hergestellt mittels PCR), P3HR1-16 latent (Spur 4 und 10), induziert (Spur 5 und 11) und induziert aufgereinigt (Spur 6 und 12) zu sehen.

Der *Primer Extension*-Versuch war sehr spezifisch, da keinerlei Signale in den Ansätzen mit DG75-RNS erhalten wurden (Spuren 2 und 8). Vergleich man die erwarteten Längen

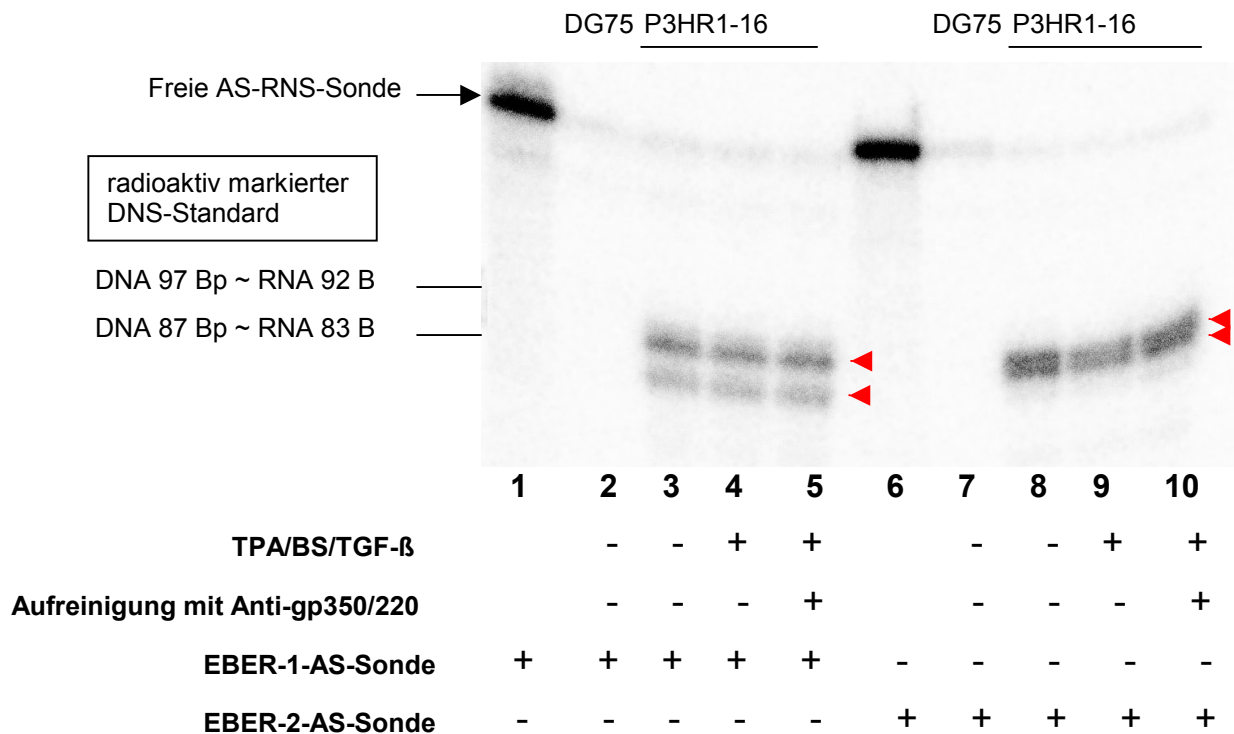
unmodifizierter EBER-Transkripte (Spuren 3 und 9) mit den erhaltenen Längen mit RNS aus latent infizierten Zellen (Spuren 4 und 10), induzierten Zellen (Spuren 5 und 11) und induzierten, aufgereinigten Zellen (Spuren 6 und 12), so konnte am 5'-Ende keine Verlängerung nachgewiesen werden. Bei EBER-1 waren nur Unterschiede in den verkürzten Formen zwischen Latenz und viraler Replikation zu sehen (Spuren 4 und 6). Diese Unterschiede konnten durch ungleich verkürzte Formen des EBER-1-Transkripts hervorgerufen werden, oder durch Probleme der reversen Transkriptase mit Sekundärstrukturen. Das Volllänge-5'-Ende von EBER-2 war in allen Ansätzen nur sehr schwach nachzuweisen (Spuren 10, 11, 12). Dies konnte darauf hinweisen, dass sich das 5'-Ende von EBER-2 durch Sekundärstrukturen einer genauen Untersuchung durch die reverse Transkriptase entzog, oder dass das 5'-Ende von EBER-2 sofort nach Transkription verkürzt wurde.

Da am 5'-Ende, wie zu erwarten, keine Verlängerung, die verlangsamte Laufverhalten im *Northern Blot*-Experiment erklären konnte, nachzuweisen war, wurde als nächstes das 3'-Ende der EBER-Transkripte untersucht.

### **3.3.3 *RNase Protection*-Experimente zeigten keine Unterschiede am 3'-Endes von EBER-1 und EBER-2 zwischen Latenz und viraler Replikation**

Zur Untersuchung des 3'-Endes der EBER-Transkripte wurde mit Hilfe der *in vitro* Transkription (IVT) eine Anti-sense-RNS hergestellt, von der ein Teil mit dem 3'-Ende der zu untersuchenden RNS hybridisierte. So entstand ein Hybrid, das in der Mitte doppelsträngig war und sowohl am 5'-, als auch am 3'-Ende einen einzelsträngigen Anteil besaß. Der einzelsträngige Anteil wurde mit RNase abverdaut. Der doppelsträngige Rest wurde in einem denaturierendem Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Im konkreten Fall wurden die in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Vektoren für EBER-1 und EBER-2 mit *Nru* I linearisiert und daraus radioaktiv markierte Anti-Sense-Transkripte hergestellt (siehe Kapitel 2.4.5). Mit diesen Sonden wurden die Transkripte EBER-1 und EBER-2 von latent, produktiv-infizierten sowie aufgereinigten produktiv infizierten P3HR1-16-Zellen (Induktion siehe Kapitel 2.3.1; Aufreinigung siehe Kapitel 2.3.4.1) im *RNase Protection*-Experiment (siehe Kapitel 2.4.11) untersucht. Die Ergebnisse der Versuche sind in Abbildung 3.3.3 zusammengefasst.



**Abbildung 3.3.3: RNase Protection-Experimente lieferten keine Unterschiede zwischen latenten Transkripten und Transkripten der produktiven Virusvermehrung.** Je 1,5  $\mu$ g RNS wurden mit der Anti-Sense-RNS-Sonde über Nacht hybridisiert. Nach Verdau mit RNase wurde das Hybrid aufgereinigt und in einem 12,5 %-igem denaturierendem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Signale wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Spur 1 und 6: freien *Anti-Sense*-Sonden; Spur 2 und 7: Negativkontrolle DG75-Zellen

Spur 3 und 8: RNS aus latenten P3HR1-16-Zellen; Spur 4 und 9: RNS aus induzierte P3HR1-16-Zellen;

Spur 5 und 10: RNS aus induzierten, gp350/220-aufgereinigten P3HR1-16-Zellen

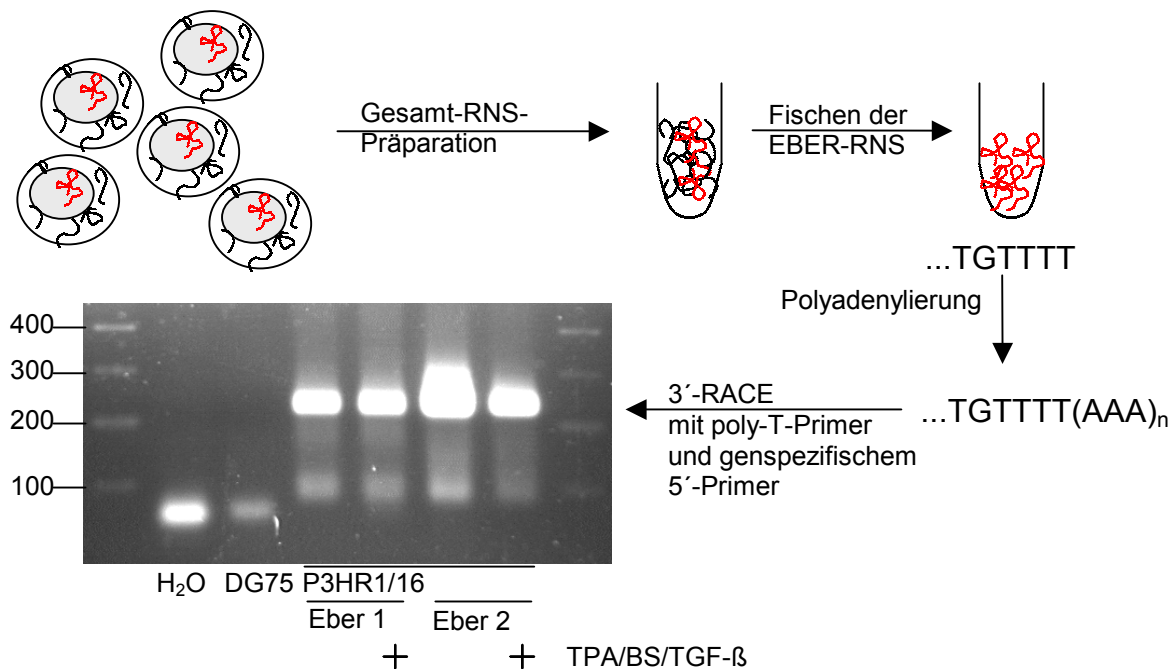
Der Versuch war spezifisch für die EBER-Transkripte, da keine Signale bei den Ansätzen mit RNS aus EBV-negativen DG 75-Zellen zu sehen waren (Spuren 2 und 7). Der protektierte Bereich in den Transkripten EBER-1 und EBER-2 sollte 89 bzw. 91 Basen lang sein. Es war bei beiden Transkripten sowohl die erwartete Länge (obere Bande, Spuren 3-6 und 8-10) als auch eine verkürzte Version (untere Bande, Spuren 3-6 und 8-10) zu sehen. Diese Banden von verkürzter RNS konnten von fehlerhaften Hybridisierungen herrühren, oder von tatsächlichen Verkürzungen in den RNS-Transkripten. Es traten aber keine Unterschiede in den Signalen aus latenten (Spuren 3 und 8), induzierten (Spuren 4 und 9) sowie induzierten und aufgereinigten P3HR1-16-Zellen auf (Spuren 5 und 10).

Da mittels *RNase Protection*-Experimenten methodisch bedingt nur Verkürzungen einer RNS nachgewiesen werden können, wurden die EBER-Transkripte außerdem noch mit einer 3'-RACE untersucht.

### 3.3.4 3'-RACE ergab Modifikationen von EBER-1 und EBER-2 beim Übergang von der viralen Latenz in die virale Replikation

Bei einer 3'-RACE wird mit einem universellen Poly-T-Primer und einem genspezifischen 5' gelegenen Primer mRNA in DNS umgeschrieben und der 3'-Bereich der RNS amplifiziert. Hierdurch kann nach Sequenzierung das genaue 3'-Ende der RNS bestimmt werden.

Da die EBER-Transkripte, die von Polymerase III exprimiert werden, nicht polyadenyliert werden, mussten die EBER-Transkripte aufgereinigt (siehe Kapitel 2.3.3.2) und nachträglich *in vitro* polyadenyliert werden (siehe Kapitel 2.4.9.4). Nun konnte in einer 3'-RACE (siehe Kapitel 2.4.9.4) mit einem Poly-T-Primer (CDS) und einem genspezifischen 5'-Primer (EBER-1 5' bzw. EBER-2 5') sowohl das genaue 3'-Ende als auch in diesem Fall durch die geringe Länge der Transkripte die gesamte Sequenz untersucht werden (siehe Abbildung 3.3.4). Hierzu wurden die amplifizierten Fragmente in einen TA-Vektor kloniert, Bakterien (TOP 10) mit diesen Vektoren transformiert und die Vektor-DNS aus Einzelkolonien mit den Sequenzierprimern T7 und Sp6 sequenziert.



**Abbildung 3.3.4: 3'-RACE der EBER-Transkripte.** Aus der Gesamt-RNS von  $1 \times 10^7$  latent und produktiv infizierten P3HR1-16-Zellen wurden die EBER-Transkripte mit dem MACS-System herausgereinigt und *in vitro* polyadenyliert. Die polyadenylierte EBER-1/2-RNS wurde in ein 3'-RACE-Experiment mit poly-T-Primer und einen Gen-spezifischem 5'-Primer eingesetzt. Die amplifizierten Fragmente wurden in einen TA-Vektor kloniert und sequenziert.

Die RACE-RT-PCR war spezifisch für die EBER-Transkripte, da mit RNS aus EBV-negativen DG75-Zellen keine Amplifikate erzeugt wurden (Spur DG75). Die Sequenzierungen der klonierten RACE-Fragmente aus EBER-1/2-Transkripten, die aus latenten und induzierten P3HR1-16-Zellen gewonnen wurden, zeigten in diesem Fall Unterschiede (siehe Anhang 2). Die Sequenzen der Transkripte aus latent-infizierten Zellen stimmten mit der Referenzsequenz aus B95-8 überein. Die Sequenzierungen der Transkripte von EBER-1 und EBER-2 aus Zellen, in denen die produktive Virusvermehrung induziert wurde, zeigten in der Nukleotidsequenz Basenaustausche: in EBER-1 von Adenosin nach Thymin (Position 73 in zwei unterschiedlichen Sequenzierungen) und bei EBER-2 von Thymin nach Cytosin (Position 23, 120, 134 und 151; jeweils nur in einer Sequenzierung). Bei der geringen Zahl der untersuchten EBER-Klone und der relativ hohen Variabilität der Modifikationen, konnten aber keine statistisch signifikanten Aussagen über gezielte Modifikationen der EBERs in der produktiven Vermehrungsphase des Virus getroffen werden. Diese Austausche mussten nicht notwendigerweise durch gezieltes *RNA-Editing* verursacht worden sein. Allerdings entsprach der Austausch von Thymin nach Cytosin dem Schema des Uracil-Cytosin-*Editing*. Das 3'-Ende unterschied sich nur durch eine unterschiedliche Anzahl von Thymin-Nukleotiden. Es wurden aber keine Verlängerungen der Sequenzen gefunden.

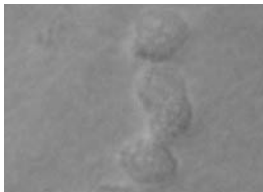
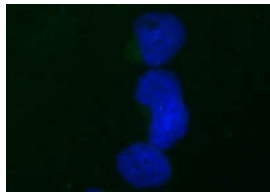
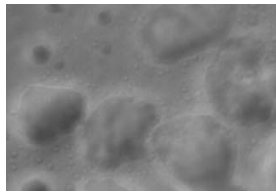
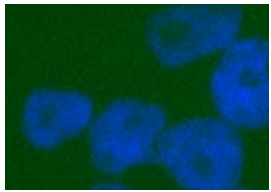
Zusammenfassend konnte festgehalten werden, dass die EBER-Transkripte beim Übergang von der Latenz in die virale Replikation auf Nukleotidebene möglicherweise modifiziert wurden. Der Unterschied im Laufverhalten von EBER-Transkripten aus latent- infizierten Zellen und produktiv-infizierten Zellen, der im *Northern Blot* gefunden wurde, konnte nur durch diese Basenaustausche aber nicht erklärt werden. Denkbar wäre jedoch, dass die EBER-Transkripte kovalent modifiziert wurden.

### 3.4 Lokalisation von EBER-1 und EBER-2 in der Latenz und in der replikativen Phase von EBV

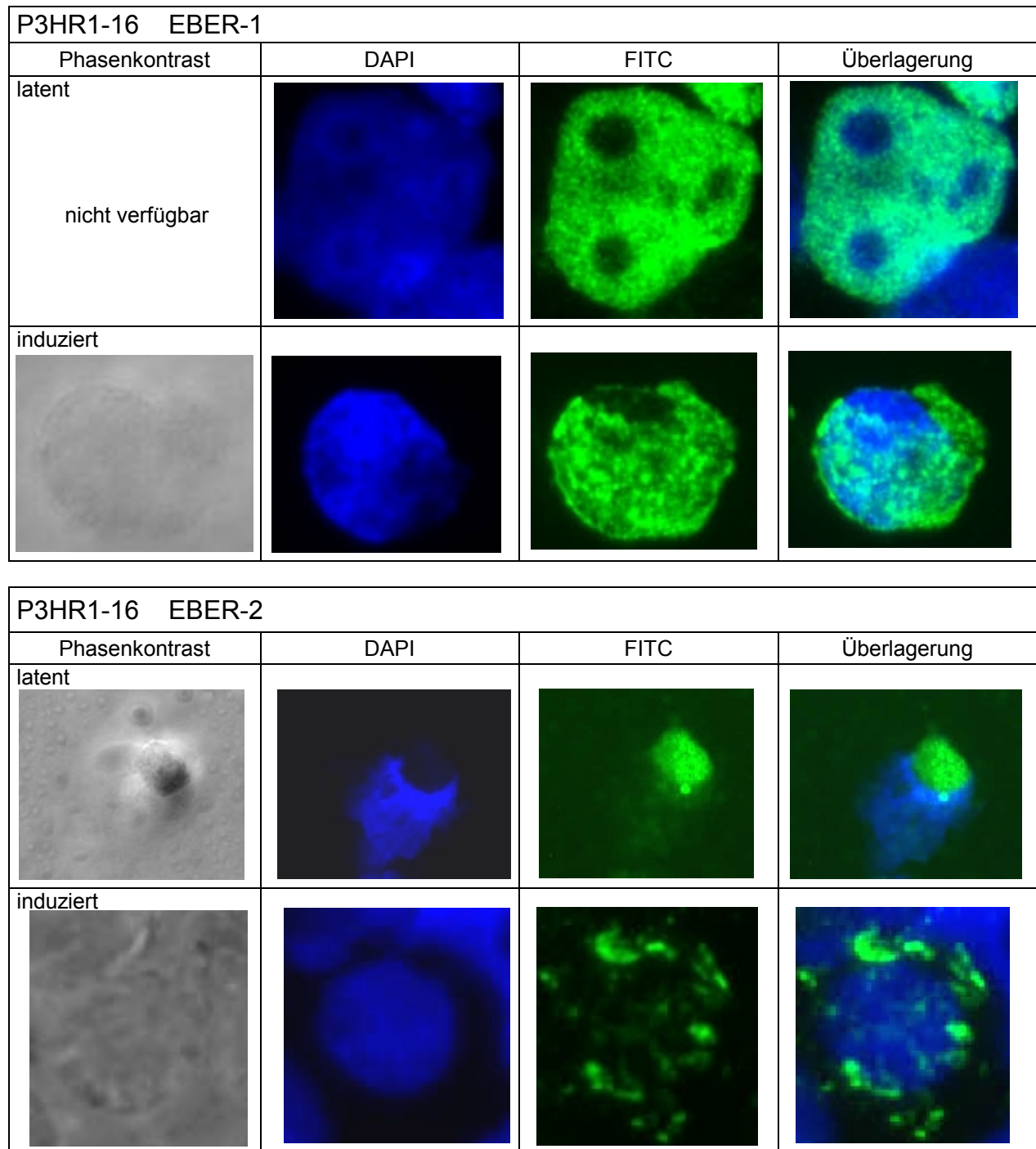
Im vorangehenden Kapitel wurden die EBER-Transkripte der Latenz und der produktiven Virusvermehrung auf Nukleotidebene untersucht. Neben der Modifikation der Transkripte selbst, konnte auch die Lokalisation einen Einfluss auf die Funktion und den Metabolismus der EBER-RNS beim Übergang von der Latenz in die produktive Virusvermehrung haben und sich sowohl gegenseitig bedingen als auch voneinander unabhängig sein. Daher war ein weiterer Ansatz die Lokalisation der EBER-Transkripte mit der *Fluorescence in situ Hybridisation* (FISH) -Methode zu untersuchen. Die Auswertung der FISH-Versuche erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop, mit dem jeweils eine Phasenkontrastaufnahme, eine Aufnahme des DAPI-Signals (Kernlokalisierung) und eine Aufnahme des FITC-Signals von demselben Ausschnitt des Objektträgers gemacht wurde. Mit dem Programm *Metaview* konnten die Aufnahmen des DAPI- und des FITC-Signals überlagert werden, wodurch Aussagen über die Lokalisation getroffen werden konnten.

#### 3.4.1 Unterschiedliche Lokalisierung von EBER-1 und EBER-2 in der Viruslatenz und während der produktiven Virusvermehrung

Um die Lokalisierung der EBER-Transkripte in EBV-positiven Zellen, die latent infiziert sind, und in EBV-positiven Zellen, in denen EBV repliziert (siehe Kapitel 2.3.1), zu untersuchen, wurden entsprechend behandelte und unbehandelte Zellen auf Objektträgern fixiert, Sonden für EBER-1 und EBER-2 an die RNS hybridisiert und anschließend die Sonden durch Fluoreszenzmarkierte Antikörper detektiert (siehe Kapitel 2.3.7). Die Ergebnisse der FISH-Experimente sind in Abbildung 3.4.1 dargestellt.

| DG75 (EBV-negativ)  |   |  |   |
|---|---|--|---|
| EBER-1 Sonde  |   | EBER-2 Sonde   |   |
| Phasenkontrast  | Überlagerung  | Phasenkontrast   | Überlagerung  |
|  |  |  |  |





**Abbildung 3.4.1: Lokalisierung von EBER-1 und EBER-2 in der Viruslatenz und während der Virusvermehrung.** Je  $3 \times 10^5$  latent infizierte und induzierte P3HR1-16-Zellen pro Ansatz wurden auf silanisierten Objektträgern fixiert und schrittweise mit Ethanol entwässert. 2ng DIG-markierte Sonde pro  $\mu$ l Hybridisierungslösung wurden hybridisiert. Zum Nachweis der gebundenen Sonden wurden drei Antikörper nacheinander gebunden: zuerst ein Maus- Anti- DIG- Antikörper, dann ein Kanninchen-Anti-Maus-AK FITC-gekoppelt und als letztes ein Schwein-Anti-Kanninchen-AK FITC-gekoppelt. Bei der Inkubation des letzten Antikörpers wurde DAPI zugegeben, um die genomische DNS zu färben. Zum Schluss wurden die Zellen mit Ethanol schrittweise entwässert und getrocknet. Die eingebetteten Zellen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop von Leika (CRMx) mit der *Metaview-Software* ausgewertet.

DG75 : Überprüfung der Spezifität der Sonden für EBER-1 und EBER-2 in EBV-negativen Zellen

P3HR1-16 : jeweils Phasenkontrast, DAPI-Färbung der DNS im Zellkern, FITC- Signal der Sonden und Überlagerung von DAPI und FITC-Signal der EBERs in latenten und in induzierten P3HR1-16-Zellen.

Die DNS-Sonden (EBER-1 bio und EBER-2 bio) für die FISH-Versuche hybridisierten ausreichend spezifisch, da in EBV-negativen DG75-Zellen keine Signale für EBER-1 und EBER-2 erhalten wurden (Tafel DG75 jeweils Überlagerung).

Die genomische DNS im Zellkern wurde mit DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Nucleoli waren durch dunklere Stellen in der Färbung zu erkennen, da diese Kompartimente im Zellkern vor allem ribosomale RNS und weniger DNS enthalten (Tafel P3HR1-16 latent EBER-2 DAPI).

Die Aufnahmen von DAPI- und FITC-Färbung wurden mit der Metaview-Software übereinandergelegt, um bestimmen zu können, ob es sich um eine nukleäre oder zytoplasmatische Fluoreszenz handelte. Bei latent infizierten P3HR1-16-Zellen sparte die FITC-Färbung von EBER-1 die gleichen Stellen im Kern aus (Tafel P3HR1-16 latent EBER-1 FITC), wie in der DAPI-Färbung (Tafel P3HR1-16 latent EBER-1 DAPI). Auch hatte der Zellkern die gleichen Abmessungen wie das FITC-Signal (Tafel P3HR1-16 latent EBER-1 Überlagerung), weshalb für EBER-1 eine Kernlokalisation in latent infizierten EBV-positiven Zellen gefolgert wurde.

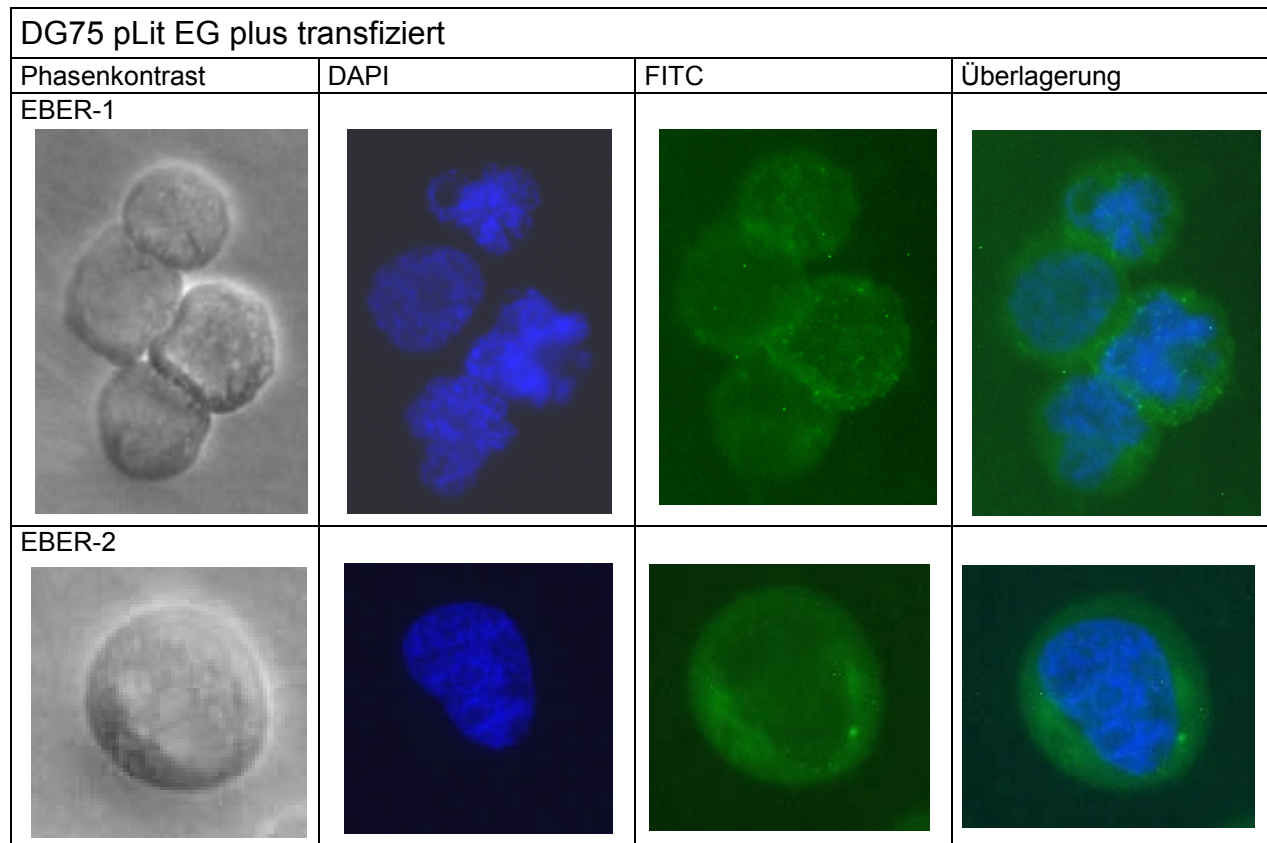
Das EBER-2-FITC-Signal war ebenfalls nur im Kern der Zellen lokalisiert (Tafel P3HR1-16 latent EBER-2 FITC). Im Gegensatz zu EBER-1 war hingegen genau dort ein Signal zu sehen, wo keine DAPI-Färbung (Tafel P3HR1-16 latent EBER-2 DAPI) zu erkennen war (Tafel P3HR1-16 latent EBER-2 Überlagerung), weshalb EBER-2 in latent infizierten EBV-positiven Zellen in den Nucleoli lokalisiert war.

Nach Induktion der viralen Replikation waren beide EBER-Transkripte im Zytoplasma zu finden. Diese Schlussfolgerung wurde aus der Beobachtung gezogen, dass die FITC-Färbungen größere Flächen einnahmen, als die Kernfärbungen (Tafel P3HR1-16 induziert EBER-1 Überlagerung und Tafel P3HR1-16 induziert EBER-2 Überlagerung).

### **3.4.2 Die Lokalisation der EBER-Transkripte im Zellkern war von viralen Proteinen abhängig**

In latent infizierten Zellen war EBER-1 im Zellkern und EBER-2 in den Nucleoli lokalisiert; in produktiv infizierten Zellen waren beide EBER-Transkripte im Zytoplasma. Eine mögliche Beteiligung von viralen Faktoren an der Umlagerung der EBER-Transkripte sollte dadurch geklärt werden, dass die Lokalisation von EBER-1 und EBER-2 in EBV-negativen Zellen untersucht wurde.

Hierzu wurde ein Expressionsplasmid (pLit EG plus), das beide EBER-Gene enthielt, in EBV-negative Zellen transfiziert (siehe Kapitel 2.3.2) und die Lokalisation der EBERs mit Hilfe der FISH-Technik untersucht (siehe Kapitel 2.3.7). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.4.2 zusammengefasst.



**Abbildung 3.4.2: Lokalisation der EBER-Transkripte in EBV-negativen Zellen.** Je  $1 \times 10^7$  DG75-Zellen wurden mit  $40 \mu\text{g}$  pLitEG plus transfiziert und nach 48 Stunden die lebenden Zellen über ein Ficoll-Kissen abgetrennt. Je  $3 \times 10^5$  transfizierte Zellen pro Ansatz wurden auf Objektträgern fixiert, mit DIG-markierter Sonde hybridisiert. Zum Nachweis der gebundenen Sonde wurden drei Antikörper nacheinander inkubiert: zuerst ein Maus-Anti-DIG-Antikörper, dann ein Kaninchen-Anti-Maus-AK FITC-gekoppelt und als letztes ein Schwein-Anti-Kaninchen-AK FITC-gekoppelt. Bei der Inkubation des letzten Antikörpers wurde DAPI zugegeben, um die DNS zu färben. Die eingebetteten Zellen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop von Leika (MCRX) mit der *Metaview-Software* ausgewertet. EBER-1 und EBER-2: jeweils Phasenkontrast, DAPI-Färbung der DNS im Zellkern, FITC-Signal der Sonden, Überlagerung von DAPI- und FITC-Signal.

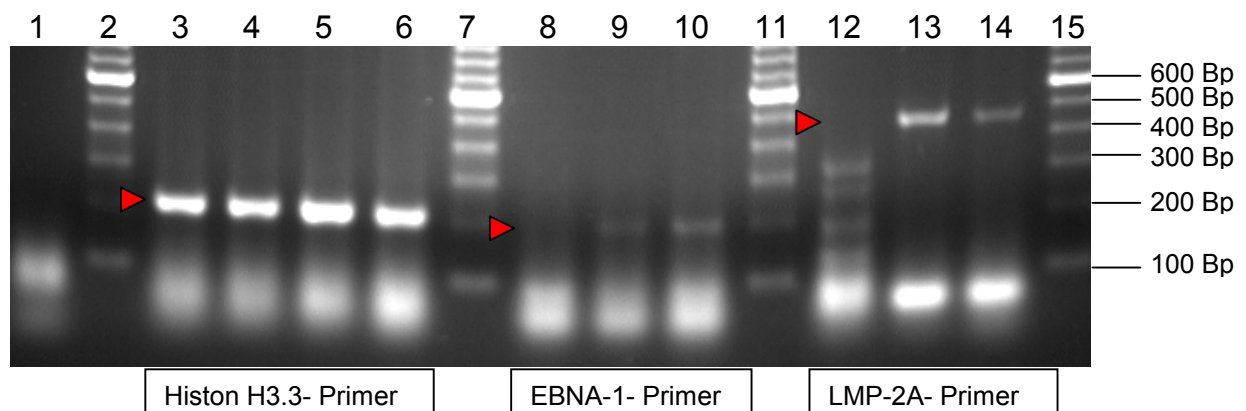
Betrachtete man jeweils die FITC-Signale, so konnte man um eine dunklere Mitte einen helleren Kreis erkennen (Tafel DG75 pLitEG plus transfiziert jeweils FITC). Bei der Überlagerung konnte man deutlich erkennen, dass die FITC-Signale mehr Raum einnahmen als der DAPI-gefärbte Kern (Tafel DG75 pLitEG plus transfiziert jeweils Überlagerung). Im Gegensatz zu EBV-positiven Zellen (siehe Abbildung 3.4.1), wo die Signale im Kern bzw. in den Nukleoli lokalisiert waren, waren die EBER-Transkripte in transient transfizierten EBV-negativen Zellen

im Zytoplasma lokalisiert. Dies ließ vermuten, dass die Lokalisation der EBER-Transkripte im Kern bzw. in den Nukleoli durch latente Proteine von EBV beeinflusst wird.

### 3.4.3 EBNA-1 und / oder LMP-2A modulierten die Lokalisation der EBER-Transkripte

Das Ziel nachfolgender Experimente war es, herauszufinden, welche der viralen Proteine der Viruslatenz an der Lokalisation von EBER-1 und EBER-2 beteiligt sind. Die EBER-Transkripte wurden bislang in allen latent infizierten Zellen nachgewiesen. Zwei virale Proteine, die in fast allen Formen der Latenz exprimiert werden, sind EBNA-1 (nicht in ruhenden Zellen, Lat 0) und LMP-2A (nicht in Burkitt's-Lymphom-Zellen, Lat 1). Expressionsplasmide für diese Proteine (siehe Kapitel 2.3.2) wurden daher mit Expressionsplasmiden für die EBER-Transkripte in EBV-negative DG75-Zellen kotransfiziert und mittels FISH die Lokalisation der EBERs untersucht.

Die Expression von EBNA-1 und LMP-2A wurde durch eine RT-PCR überprüft (siehe Kapitel 2.4.9.2). Hierzu wurde aus dem Rest, der für die FISH-Experimente nicht verwendeten Zellen, RNS präpariert und auf die mRNS für EBNA-1<sup>8</sup> und LMP-2A<sup>9</sup> getestet (siehe Abbildung 3.4.4.1).



**Abbildung 3.4.4.1: RT-PCR der transfizierten DG75-Zellen auf Histon H3.3, EBNA-1 und LMP-2A.**


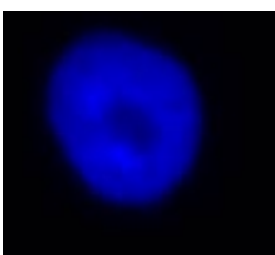
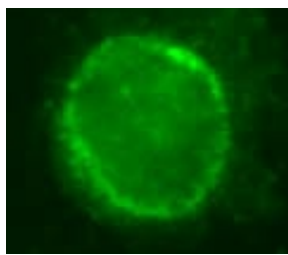
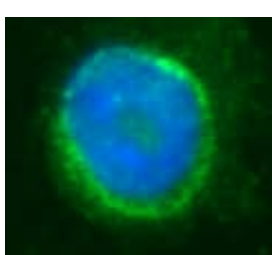
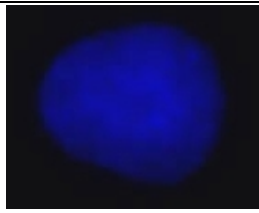
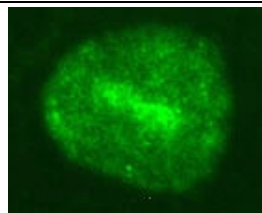
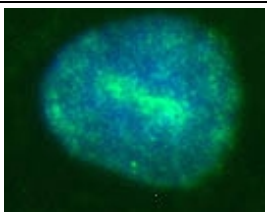
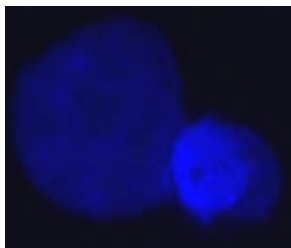
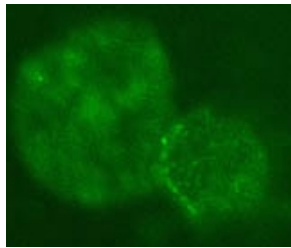
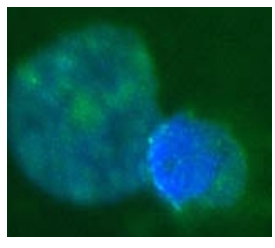
Aus je ca.  $9 \times 10^6$  transfizierten Zellen wurde Gesamt-RNS präpariert. Ca. 500ng RNS aus jeder Transfektion wurde in eine RT-PCR auf Histon H3.3, EBNA-1 und LMP-2A eingesetzt.

Spur 1: Wasserkontrolle; Spur 2, 7, 11, 15: DNS-Standard; Spur 3, 8, 12: DG75 pLit EG plus transfiziert  
 Spur 4, 9: DG75 pLit EG plus und pRep9 transfiziert; Spur 5, 13 : DG75 pLit EG plus und pCMV LMP-2A transfiziert; Spur 6, 10, 14: DG75 pRep EG plus und pCMV LMP-2A transfiziert.

<sup>8</sup> Primer: pRep EBNA-1 5' und pRep EBNA-1 3'

<sup>9</sup> Primer: LMP2A RT 5' und LMP2A RT 3'

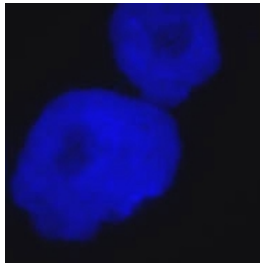
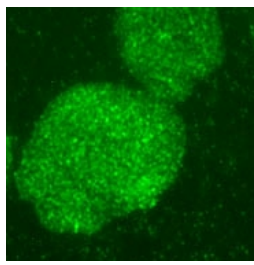
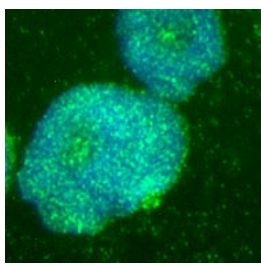
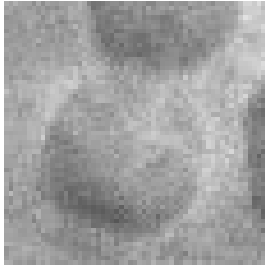
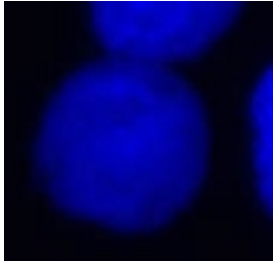
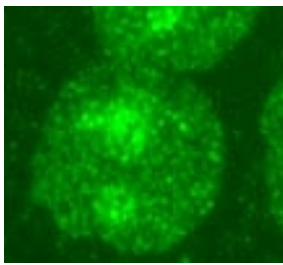
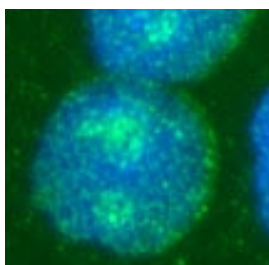
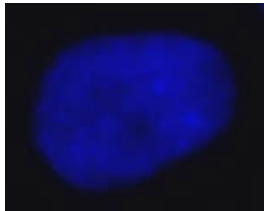
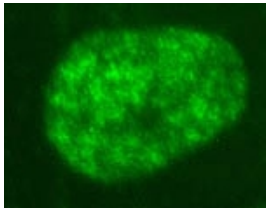
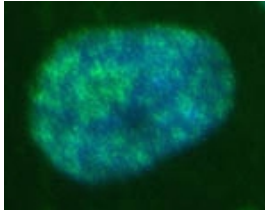
Die Kontroll-RT-PCR mit den Histon H3.3-Primern zeigt in allen Ansätzen (Spuren 3-6) gleiche Signale bei 215 Bp und bestätigte damit eine vergleichbare Menge und Qualität der isolierten RNS in allen Ansätzen. Bei den Kotransfektionen, bei denen EBNA-1 exprimiert werden sollte (Spur 9 und 10), war ein Signal bei 190 Bp zu erkennen, nicht aber in der Negativkontrolle in Spur 8 (kein EBNA-1). Auch die RT-PCR Experimente für LMP-2A zeigten wie erwartet in den Spuren 13 und 14 die Signale von LMP-2A bei 477 Bp, nicht aber in der Negativkontrolle in Spur 12. Daraus wurde gefolgert, dass in den Kotransfektions-Experimenten, die mit Hilfe des FISH ausgewertet wurden, die Proteine EBNA-1 und LMP-2A exprimiert wurden (siehe Abbildung 3.4.4.2).

| EBER-1   |   |  |   |
|--|---|--|---|
| Phasenkontrast   | DAPI  | FITC   | Überlagerung  |
| EBNA-1<br> |   |   |   |
| LMP-2A<br><br>nicht verfügbar  |  |  |  |
| EBNA-1 + LMP-2A<br><br>nicht verfügbar   |  |  |  |

**Abbildung 3.4.4.2: EBNA-1 und/oder LMP-2A modulierten die Lokalisation der EBER-Transkripte.**

Je  $1 \times 10^7$  DG75-Zellen wurden mit 15  $\mu\text{g}$  pLitEG plus und 25  $\mu\text{g}$  pRep 9 (EBNA-1 Cotransfektion), bzw. 25  $\mu\text{g}$  pLit EG plus und 25  $\mu\text{g}$  pCMV LMP-2A (LMP-2A Cotransfektion) bzw. 35  $\mu\text{g}$  pRep EG plus und 15  $\mu\text{g}$  pCMV LMP-2A (EBNA-1 und LMP-2A Kotransfektion) transfiziert und nach 48 Stunden die lebenden Zellen über ein Ficoll-Kissen abgetrennt. Je  $3 \times 10^5$  transfizierte DG75-Zellen pro Ansatz wurden auf silanisierten Objektträgern fixiert und schrittweise mit Ethanol entwässert. 2ng DIG-markierte Sonde pro  $\mu\text{l}$  Hybridisierungslösung wurden hybridisiert, nachhybridisiert und mit TTBS gewaschen. Zum Nachweis des Digoxigenins wurden drei Antikörper nacheinander gebunden: zuerst ein Maus-Anti-DIG-Antikörper, dann ein Kaninchen-Anti-Maus-AK FITC-gekoppelt und als letztes ein Schwein-Anti-Kaninchen-AK FITC-gekoppelt. Bei der Inkubation des letzten Antikörpers wurde DAPI zugegeben, um die genomische DNS zu färben. Zum Schluss wurden die Zellen wieder mit Ethanol schrittweise entwässert und getrocknet. Die eingebetteten Zellen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop von Leika (MCRX) mit der *Metaview-Software* ausgewertet (jeweils Phasenkontrast, DAPI-Färbung der genomischen DNS im Zellkern, FITC-Signal der Sonden, Überlagerung von DAPI- und FITC-Signal).



| EBER-2  |  |   |  |
|---|--|---|--|
| Phasenkontrast  | DAPI   | FITC  | Überlagerung   |
| EBNA-1<br><br>nicht verfügbar   |   |   |   |
| LMP-2A<br> |   |   |   |
| EBNA-1 + LMP-2A<br><br>nicht verfügbar  |  |  |  |

### EBNA-1

Die Kotransfektion von EBNA-1 hatte keine Auswirkung auf die Lokalisation von EBER-1. Die EBER-1-Signale waren in einem Ring um den Zellkern angeordnet (Tafel EBER-1 / EBNA-1 / FITC und Überlagerung), d.h. EBER-1 war im Zytoplasma lokalisiert. Im Unterschied zu Zellen, in die das Expressionsplasmid für die EBERs ohne Kotransfektion eines Expressionsplasmids für EBNA-1 transfiziert wurde, waren die Signale für EBER-1 diffuser im Zytoplasma verteilt. Dies konnte durch EBNA-1 beeinflusst sein, aber auch einfach daran liegen, dass die Zellen sich nach der Fixierung nicht immer gleichen.

Im Gegensatz zu EBER-1 lokalisierte EBER-2 bei Kotransfektion eines Expressionplasmids für EBNA-1 im Kern, nicht aber in den Nukleoli wie in EBV-positiven Zellen (Abschnitt 3.4.1). Das EBER-2-Signal war auf die Fläche des Zellkerns beschränkt (Tafel EBER-2 / EBNA-1 / FITC und Überlagerung). EBNA-1 hatte demnach Einfluss auf die Lokalisation von EBER-2 (siehe Abbildung 3.4.2), aber die Lokalisation wie in EBV-positiven Zellen, nämlich in den Nukleoli, konnte EBNA-1 nicht rekonstituieren.

### **LMP-2A**

Die Kotransfektion eines Expressionsplasmids für LMP-2A hatte bei EBER-1 und EBER-2 eine Verdichtung der Signale (Tafel EBER-1 / LMP-2A / FITC und Tafel EBER-2 / LMP-2A / FITC) an den Stellen zur Folge, an denen in der DAPI-Färbung (Tafel EBER-1 LMP-2A DAPI und Tafel EBER-2 LMP-2A DAPI) die Nukleoli zu erkennen waren (dunkle Stellen in der DAPI-Färbung). Diese Lokalisation beider EBER-Transkripte in den Nukleoli war nicht ausschließlich (Tafel EBER-1 / LMP-2A Überlagerung und Tafel EBER-2 / LMP-2A Überlagerung).

### **EBNA-1 und LMP-2A**

Die Signale der EBER-Transkripte waren bei der Kotransfektion von Expressionsplasmiden für EBNA-1 + LMP-2A sehr schwach (Tafel EBER-1 / EBNA-1 + LMP-2A / FITC und Tafel EBER-2 / EBNA-1 + LMP-2A / FITC). Es war keine Kooperativität durch EBNA-1 und LMP-2A zu erkennen. Die EBER-Transkripte schienen im Kern an bestimmten Stellen verdichtet vorzuliegen (Tafel EBER-1 / EBNA-1 + LMP-2A / Überlagerung und Tafel EBER-2 / EBNA-1 + LMP-2A / Überlagerung), aber es fand keine Relokalisation wie in EBV-positiven Zellen, nämlich EBER-1 im Zellkern und EBER-2 im Nukleoli, statt.

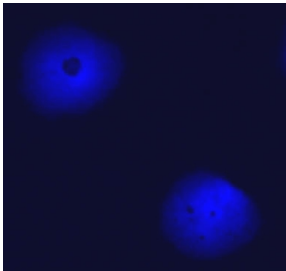
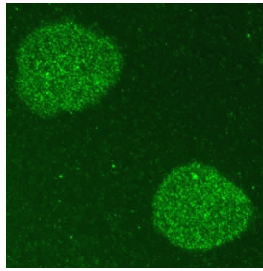
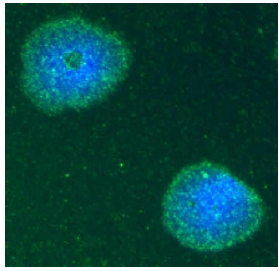
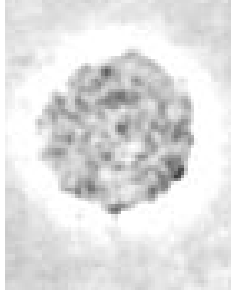
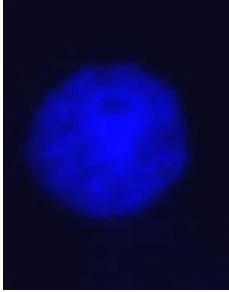
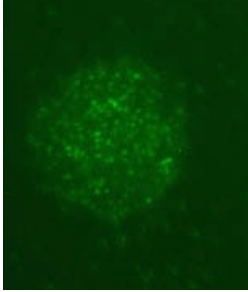
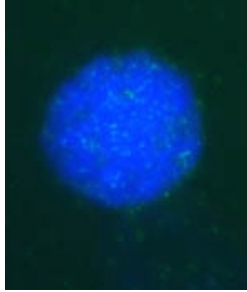
Die Proteine EBNA-1 und LMP-2A hatten für sich alleine einen Einfluss auf die Lokalisation der EBER-Transkripte in EBV-negativen Zellen: EBNA-1 lokalisierte EBER-2 im Kern und LMP-2A lokalisierte die EBER-Transkripte bevorzugt in den Nukleoli. An der Lokalisation der EBER-Transkripte wie in EBV-positiven Zellen müssen jedoch noch andere EBV-Faktoren beteiligt sein.

### **3.4.4 Der Transport der EBER-Transkripte vom Kern in das Zytoplasma produktiv-infizierter Zellen ist ein aktiver Prozess**

Nun sollte noch geklärt werden, ob es sich bei der Umlagerung vom Zellkern in das Zytoplasma um einen aktiven Transport bei der Induktion der viralen Replikation handelte. Durch Leptomycin B (LMB) läßt sich ein Weg (z.B. der Export über Exportin) des aktiven Transports vom Kern in das Zytoplasma hemmen. Durch Induktion der viralen Replikation (siehe Kapitel 2.3.1) und anschließende Hemmung des Zytoplasmatransports durch LMB (siehe Kapitel 2.3.2)

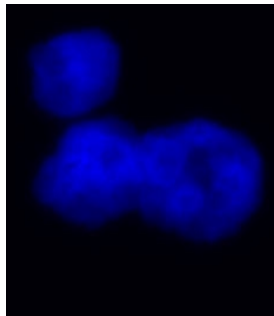
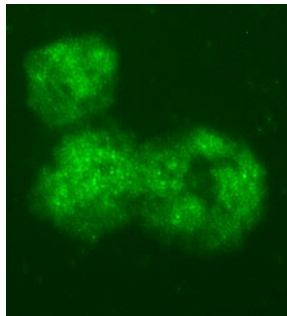
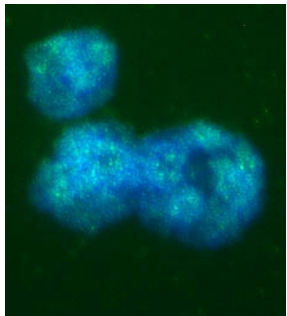
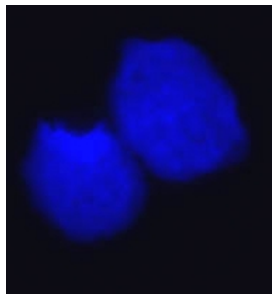
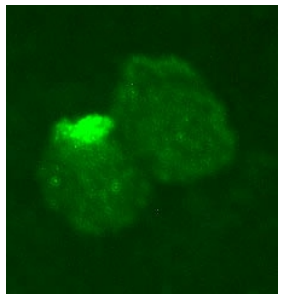
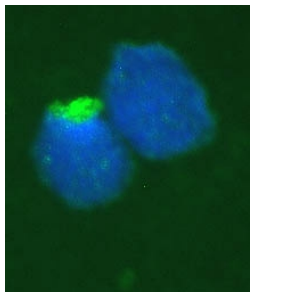
sollte überprüft werden, ob sich diese Umlagerung in EBV-positiven Zellen verhindern lässt (siehe Abbildung 3.4.4).

In EBV-negativen Zellen werden die EBER-Transkripte nicht im Kern gehalten, sondern in das Zytoplasma transportiert. Auch hier sollte überprüft werden, ob LMB den Transport ins Zytoplasma verhindern kann. Dazu wurden  $1 \times 10^7$  EBV-negative DG75-Zellen mit dem Expressionsplasmid für die EBER-Transkripte (pLit EG plus) transfiziert (siehe Kapitel 2.3.2) und nach 24 Stunden mit LMB (siehe Kapitel 2.3.2) behandelt. Die Lokalisationen wurden mit der FISH-Technik (siehe Kapitel 2.3.7) untersucht (Abbildung 3.4.4).

| P3HR1-16 induziert und LMB behandelt  |   |  |   |
|---|---|--|---|
| Phasenkontrast  | DAPI  | FITC   | Überlagerung  |
| EBER-1<br><br>nicht verfügbar   |   |   |   |
| EBER-2<br> |  |  |  |

**Abbildung 3.4.4: Hemmung des Kernexports mit Leptomycin B.** Je  $1 \times 10^7$  P3HR1-16-Zellen wurden mit TPA/BS/TGF- $\beta$  für 24 Stunden induziert, danach für 24 Stunden mit LMB behandelt und die lebenden Zellen über ein Ficoll-Kissen abgetrennt. Auch je  $1 \times 10^7$  DG75-Zellen wurden mit 40  $\mu$ g pLitEG plus transfiziert, nach 24 Stunden für 24 Stunden mit LMB versetzt und die lebenden Zellen über ein Ficoll-Kissen abgetrennt. Es wurden je  $3 \times 10^5$  der induzierten P3HR1-16 pro Ansatz auf silanisierten Objektträgern fixiert und schrittweise mit Ethanol entwässert. Ebenso wurde mit den transfizierten DG75 verfahren. 2ng DIG-markierte Sonde pro  $\mu$ l Hybridisierungslösung wurden hybridisiert, nachhybridisiert und mit TTBS gewaschen. Zum Nachweis des Digoxigenins wurden drei Antikörper nacheinander gebunden: zuerst ein Maus- anti- DIG-Antikörper, dann ein Kaninchen-Anti-Maus-AK FITC-gekoppelt und als letztes ein Schwein-Anti-Kaninchen-AK FITC-gekoppelt. Bei der Inkubation des letzten Antikörpers wurde DAPI zugegeben, um die genomische DNS zu färben. Zum Schluss wurden die Zellen wieder mit Ethanol schrittweise entwässert und getrocknet. Die eingebetteten Zellen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop von Leika (MCRX) mit der *Metaview-Software* ausgewertet. EBER-1 und EBER-2: jeweils DAPI- Färbung der genomischen DNS im Zellkern, FITC- Signal der Sonden, Überlagerung von DAPI- und FITC-Signal.



| DG75 pLit EG plus transfiziert und LMB behandelt |   |  |   |
|--|---|--|---|
| Phasenkontrast                                   | DAPI  | FITC   | Überlagerung  |
| EBER-1<br><br>nicht verfügbar                    |  |  |  |
| EBER-2<br><br>nicht verfügbar                    |  |  |  |

Die FITC- Signale von EBER-1 bei induzierten und mit LMB behandelten P3HR1-16-Zellen nahmen einen deutlich größere Fläche ein (Tafel P3HR1-16 induziert und LMB behandelt / EBER-1 / FITC), als der Zellkern (Tafel P3HR1-16 induziert und LMB behandelt / EBER-1 / DAPI). Bei der Überlagerung beider Aufnahmen war zu erkennen, dass das EBER-1-Signal im Zytoplasma lag. Bei EBER-2 war die Aussage nicht so eindeutig. Da das FITC-Signal (Tafel P3HR1-16 induziert und LMB behandelt / EBER-2 / FITC) aber nicht im Nukleoli lokalisiert war, wurde davon ausgegangen, dass auch hier die Lokalisation wie in latent-infizierten EBV-positiven Zellen nicht mehr bestand.

Die Analyse der *in situ* Hybridisierung von induzierten P3HR1-16, die mit LMB versetzt wurden, zeigte, dass die Umlagerung der EBER-Transkripte ins Zytoplasma bei der Induktion der viralen Replikation von LMB nicht gehemmt werden konnte.

Im Gegensatz dazu waren die EBER-1- und EBER-2-Signale in transient transfizierten Zellen nach Zugabe von LMB im Kern bzw. in Nukleoli lokalisiert. Dies war daran zu erkennen, dass das EBER-1- Signal bei der Überlagerung die gleiche Fläche einnahm wie die DAPI-Färbung des Zellkerns (Tafel DG75 pLit EG plus transfiziert und LMB behandelt / EBER-1 / Überlagerung). Bei EBER-2 waren die FITC-Signale dort lokalisiert (Tafel DG75 pLit EG plus

transfiziert und LMB behandelt / EBER-2 / FITC), wo in der DAPI-Färbung des Zellkerns durch eine dunkle Stelle ein Nukleolus angezeigt wurde (Tafel DG75 pLit EG plus transfiziert und LMB behandelt / EBER-2 / DAPI).

In EBV-positiven induzierten Zellen hatte die Behandlung mit LMB keine Auswirkungen auf die Umlagerung der EBER-Transkripte vom Kern in das Zytoplasma. Durch die Induktion der produktiven Virusvermehrung mit TPA konnte aber der Zellkern so geschwächt sein, dass die EBER-Transkripte passiv aus dem Kern diffundierten und sich im Zytoplasma verteilten. Die Zugabe von LMB zu transfizierten EBV-negativen Zellen führte zur Wiederherstellung der Lokalisation, die in EBV-positiven Zellen zu finden ist. In EBV-negativen Zellen verhinderte LMB eine Umlagerung, also musste der Transport vom Zellkern ins Zytoplasma ein aktiver Prozess sein, der eventuell durch EB-virale Proteine gesteuert wurde.

## 4 Diskussion

### ***4.1 Differentielle Expression / Regulation der EBER-Gene beim Übergang von der Latenz in die Virusvermehrung***

**EBER-Reporter zum Arbeiten in EBV-positiven Zellen.** Die kommerziellen Reporter-Systeme sind auf die Polymerase II abgestimmt. Bei der Polymerase II sind die gesamten regulatorischen Elemente vor der kodierenden Sequenz der Gene lokalisiert. Somit wird z.B. bei SEAP (sekretierbare alkalische Phosphatase)-Reporter-Plasmiden der zu untersuchende Promotor eines Gens vor die SEAP-Sequenz kloniert und durch die Bestimmung der Konzentration des Reporterproteins Rückschlüsse auf die Aktivität des Promotors gezogen. Die unterschiedliche starke Expression der SEAP kann durch eine Lumineszenzreaktion mit einem Substrat, das durch die alkalische Phosphatase aktiviert wird, untersucht werden.

Bei Polymerase III-transkribierten Genen ist dies nicht möglich, da die regulatorischen Elemente innerhalb der kodierenden Sequenz der Gene lokalisiert sind, was die Möglichkeiten für einen Reporter einschränkt. Die EBER-Transkripte werden auch von Polymerase III transkribiert, nehmen aber eine Sonderstellung ein, da bei diesen Genen eine Kombination aus Polymerase II und III –Elementen zu finden ist. Vor der kodierenden Sequenz der EBER-Gene gibt es jeweils Bindestellen für die Faktoren Sp1 und ATF und innerhalb der kodierenden Sequenz die regulatorischen Elemente der Polymerase III, Box A und Box B. Für die Expression der EBER-Gene sind sowohl die regulatorischen Elemente vor als auch innerhalb der Gene essentiell<sup>34</sup>. Um die Regulation der EBER-Gene zu untersuchen musste ein spezielles Reporterplasmid hergestellt werden, das zwei Bedingungen erfüllte: alle regulatorischen Elemente mussten in der Originalanordnung vorhanden sein und in EBV-positiven Zellen mussten die Reporter-Transkripte von den endogenen EBER-Transkripten unterscheiden werden können.

Der Reporter für die EBER-Transkripte wurde durch Verlängerung der kodierenden Sequenz von EBER-1 und EBER-2 erzeugt. Die Stellen, an denen die Verlängerung vorgenommen wurde, wurden so gesetzt, dass die regulatorischen Elemente Box A und Box B der Polymerase III intakt blieben (zweites Drittel der kodierenden Sequenzen). Die Länge der eingeschobenen Sequenzen wurde so gewählt, dass eine Unterscheidung zwischen original EBER-Transkripten und Reporter-EBER-Transkripten möglich war. Hierzu wurden die EBER-Transkripte um die

Hälfte der kodierenden Sequenz verlängert, so dass die EBER-Reporter zu einem Drittel aus Verlängerungssequenz bestanden. Dies reichte aus, um in einem funktionellen System, dem *Nuclear Run On*-Experiment, eine Unterscheidung zwischen EBER-Transkripten und Reporter-Transkripten zu ermöglichen.

**Verschiedene *DNS-Sequenzen* zur Verlängerung der EBER-Transkripte.** Zur Unterscheidung der endogenen EBER-Transkripte und der Reporter-EBER-Transkripte in EBV-positiven Zellen sollte als Verlängerung eine Sequenz verwendet werden, die weder bekannte Spleißstellen, noch regulatorische Elemente, noch funktionelle Elemente besitzt und die in den EBV-positiven Zellen nicht vorkommt. Als erstes wurden zwei Bereiche aus dem NS-1-Gen von Parvovirus B19 zur Verlängerung von EBER-1 und EBER-2 benutzt. Die Reporter-EBER-Transkripte mit diesen Verlängerungen konnten tatsächlich auch sehr spezifisch nachgewiesen werden. Ein unerwarteter Effekt der Verlängerungen mit den Fragmenten aus dem NS-1-Gen war allerdings, dass die Zellenpopulation, die mit dem Expressionsplasmid für die EBER-Reporter transfiziert wurden, mehr tote Zellen aufwies, als Zellen, die mit dem Expressionsplasmid für die EBERs transfiziert wurden. Aufgrund des unerwarteten zytopathogenen Effektes der NS-1 Bereiche, wurden die Verlängerungssequenzen des Reporter geändert.

Hierzu wurden nun Sequenzfragmente der alkalischen Phosphatase verwendet. Dieser Reporter hatte keinen Einfluss auf Vitalität der Zellen. Mit diesem neuen Reporter war die Zahl der noch lebenden Zellen nach Transfektion bei EBER-Expressionsplasmid und EBER-Reporter-Expressionsplasmid in EBV-negative Zellen gleich. Allerdings stellte sich heraus, dass bei diesem Reporter nun wiederum der spezifische Nachweis der EBER-Reporter-Transkripte im Vergleich zu den viralen EBER-Transkripten sehr schwierig war. Um die Signale der EBER-Transkripte von den Signalen der EBER-Reporter-Transkripte unterscheiden zu können, musste eine sehr hohe Hybridisierungstemperatur gewählt werden. Dies führte aber dazu, dass im *Nuclear Run On*-Experiment nur noch die EBER-, EBER-Reporter-Signale und die Signale von tRNS Serin ausreichend deutlich detektiert werden konnten. Für alle anderen Sonden war diese benötigte Temperatur zu hoch.

Diese Einschränkung war allerdings akzeptabel, da aus Vorarbeiten zur Regulation der EBER-Transkripte im Vergleich zu anderen EBV Genen der Latenz und der viralen Replikation bereits Daten aus *Run On*-Experimenten vorlagen<sup>27</sup>.

**Modifikationen verbesserten die Expression der EBER-Transkripte des Reporters.** Die Detektion der EBER-Transkripte in EBV-negativen Zellen war sehr empfindlich. Um die Regulation der EBER-Gene in EBV-negativen Zellen untersuchen zu können, waren die Konstrukte (pRep EG II plus EGFP) nicht geeignet, da die Expression der EBER-Gene zu niedrig war. Zuerst wurde angenommen, dass der Grund für diese niedrige Expression die nur geringe Transfektionsrate von ca. 30 % der Zellen war. Um eine einheitliche Population zu erhalten, wurde daraufhin den Plasmiden die codierende Sequenz für das verkürzte Maus-MHC H2K<sup>k</sup> als Selektionsmarker hinzugefügt. Damit konnten die transfizierten Zellen angereichert werden, so dass einheitliche, transfizierte Populationen entstanden. Aber auch bei diesen angereicherten, transfizierten Zellen war die Expression der EBER-Gene nicht mit der in EBV-positiven Zellen zu vergleichen. Diese schlechte Expression der EBER-Gene wurde auch von anderen Gruppen bestätigt<sup>44</sup>.

Um in EBV-negativen Zellen eine Expression vergleichbar mit der in EBV-positiven Zellen zu erreichen, wurde vor kurzem in einer Veröffentlichung von Ruf<sup>68</sup> eine Möglichkeit aufgezeigt. Hierbei wurden die EBER-Gene in ihrer natürlichen Lage im EBV-Genom kurz vor dem OriP kloniert und ein solches Expressionsplasmid in EBV-negative Zellen transfiziert, welche EBNA-1 stabil exprimierten. Bei dieser Anordnung konnte in den so produzierten stabilen Zelllinien EBER-Expression von über 100 % (verglichen mit EBV-positiven Zellen) erreicht werden.

Würde man die Plasmide pRep EG II plus (Expressionsplasmid für die viralen EBER-Gene) und pRep EGR(S) II plus (Expressionsplasmid für die EBER-Reporter) in vergleichbarer Weise rearrangieren und die EBER-Gene (bzw. die EBER-Reporter) vor den im Plasmid pRep9 enthaltenen OriP setzen, könnten damit vermutlich stabile Zelllinien erzeugt werden, die vergleichbare EBER-Transkript-Mengen (bzw. EBER-Reporter-Mengen) exprimierten wie EBV-positive Zellen. Da diese Plasmide das EBNA-1-Gen enthalten, könnte damit auch in EBV-negativen Zellen die Regulation der EBER-Gene und eine Beteiligung von viralen Proteinen an der Regulation noch detaillierter untersucht werden.

**Funktionelle Untersuchungen.** Beim Übergang von der Latenz zur viralen Replikation wird die Expression von EBER-1 abgeschaltet und EBER-2 weiter transkribiert<sup>27</sup>. Aus den Daten zur Aktivität der EBER-Gene konnte nur auf eine unterschiedliche Regulation beider Gene geschlossen werden. Nur Aufgrund dieses Vergleiches war es aber nicht möglich zu entscheiden, ob es sich um eine aktive Abschaltung des EBER-1-Gens, oder um eine aktive Aufrechterhaltung der Expression von EBER-2, oder um beide Möglichkeiten zugleich handelte. Um einen Hinweis darauf zu erhalten, welches der Gene aktiv reguliert wird, wurde die Aktivität

der EBER-Gene mit der eines anderen von der Polymerase III-transkribierten Gens, dem Gen für Serin tRNS, verglichen. Stellte man die Menge der Serin-tRNS den Mengen an EBER-Transkripten während der Latenz und der viralen Replikation gegenüber, so war ein analoges Expressionsmuster zu erkennen. Deshalb wurde davon ausgegangen, dass die Abschaltung von EBER-1 nicht spezifisch für dieses Gen erfolgte, sondern ein Effekt der allgemeinen geringeren Aktivität der Polymerase III ist. Die Expression von EBER-2 während der viralen Replikation hingegen wird aktiv durch zelluläre oder virale Faktoren fortgesetzt.

## 4.2 Molekulare Grundlagen der Regulation der EBER-Gene

**DNase I *in vitro* Footprint.** DNase I *in vitro* Footprint-Experimente wurden zum Nachweis der Faktoren, die an der Regulation der EBER-Transkription beteiligt sind, eingesetzt. Obwohl es theoretisch möglich ist, mit dieser Methode über einen größeren DNS-Bereich die Stärke der Bindung von schon bekannten Faktoren, als auch die Bindung neuer Faktoren zu ermitteln, stellte sich dies in diesem Zusammenhang als schwierig heraus. Die Menge an d(IC), die der Reaktion zum Abfangen unspezifischer Bindungen zugegeben wurde, musste sehr hoch eingestellt werden. Nur so konnte eine unspezifische Abdeckung der DNS verhindert werden. Dies hatte aber zur Folge, dass in diesen Arbeiten die Bindung der Faktoren an die DNS so schwach wurde, dass nur noch die Transkriptionsfaktoren mit sehr hoher Bindungsaffinität und ubiquitärem Vorkommen an die DNS banden.

Die bekannten Faktoren, die vor der kodierenden Sequenz der EBER-Gene binden und für die Transkription wichtig sind, konnten teilweise bestätigt werden. In Übereinstimmung mit den Arbeiten von Howe *et al.*<sup>34</sup> konnte die Bindung von Sp1, ein ubiquitärer Faktor mit starker DNS-Bindungsaffinität, nachgewiesen werden. Der Unterschied zwischen Latenz und produktiver Phase des Virus zeigte sich hier in einer verminderten Bindung des Faktors in beiden Promotoren der EBER-Gene. Dies könnte die allgemein geringere Transkriptionsaktivität der Polymerase III nach chemischer Induktion der viralen Replikation erklären und somit die Abschaltung von EBER-1. Es konnten hingegen keine weiteren Faktoren, erst nach Induktion gebunden hätten, gefunden werden, die die Aufrechterhaltung der Transkription von EBER-2 erklärten. Das DNase I *in vitro* Footprint –Experiment war in diesem Zusammenhang für die Untersuchung größerer DNS-Bereiche auf die Bindung von Transkriptionsfaktoren mit Rohkernextrakten nicht geeignet, da die Faktoren zu unterschiedliche Reaktionsbedingungen

benötigten. Auch eine Aufreinigung der Extrakte brachte keine Verbesserung, d.h. es lag nicht an einer zu geringen Konzentration der Faktoren aufgrund einer schlechten Qualität der Extrakte. Aus diesem Grund wurden einige zum Teil hypothetische Bindestellen für Transkriptionsfaktoren im EMSA gezielt untersucht.

**Eine Sequenzvariation in der Bindestelle von ATF im Promotor von EBER-2 in den Virusstämmen P3HR1-16, P3HR1-13 und Akata.** Die Analyse der genomischen Sequenz der EBER-Gene aus verschiedenen Virusstämmen zeigte, dass sich in den Zelllinien, die beim Übergang in die Virusvermehrung eine Abschaltung von EBER-1 und zugleich eine konstante Synthese von EBER-2 aufwiesen, ein Nukleotidunterschied in der Bindestelle der Transkriptionsfaktorfamilie ATF im Vergleich zu Virusstämmen befindet, bei denen die EBER-Gene nicht differentiell reguliert waren. Die Bindesequenz TGACGTAG in B95-8- und Raji-Virus ist in den Virusstämmen P3HR1-16, P3HR1-13 und Akata vor EBER-2 zu TGACGTGG geändert. Eine bessere ATF-Bindestelle könnte einen Grund für die konstante Synthese von EBER-2 nach Induktion der produktiven Virusvermehrung darstellen. Als diese unterschiedlichen Bindesequenzen im EMSA untersucht wurden, zeigte sich, dass dieser Nukleotidunterschied einen Einfluss auf die Bindung von Transkriptionsfaktoren hatte. Diese Unterschiede im Bindemuster in Abhängigkeit von der Bindestelle hatten jedoch keinen Einfluss auf die Expression der EBER-Transkripte. Dies zeigte sich darin, dass in P3HR1-16-Zellen, die mit pNegR-Plasmid (EBER-Reporter-Expressionsplasmid mit der ATF-Bindesequenz aus dem B95-8-Stamm) transfiziert wurden, im *Nuclear Run On*-Experiment eine Regulation der EBER-Reporter stattfand, die der endogenen EBER-Gene der P3HR1-16-Zellen entsprach. Somit wurden sowohl die EBER-Gene (mit der Sequenzvariation in der ATF-Bindestelle) als auch die EBER-Reporter (Konsensussequenz aus B95-8-Virus) gleich exprimiert.

Daraus folgte, dass die unterschiedlichen Faktoren aus der ATF-Familie, die in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Bindestellen vor EBER-1 und EBER-2 banden, die differentielle Regulation der EBER-Gene nicht erklärten.

**NFW als neuer Faktor im Promotor von EBER-2.** Die Computeranalyse der Promotoren von EBER-1 und EBER-2 hat einige neue mögliche Bindestellen von bekannten Transkriptionsfaktoren aufgezeigt. Im EMSA wurden zunächst die Bindestellen für GCF und NFW untersucht.

Bei der Bindestelle für GCF wurde im Gegensatz zu der NFW-Bindestelle kein Hinweis auf eine Bindung des spezifischen Faktors in den verwendeten Kernextrakten gefunden. In der Literatur

ist beschrieben, dass es mindestens zwei Faktoren gibt, die an die NFW-Bindestelle binden können: einen, der generell in B-Zellen vorkommt und einen, der durch Induktion mit TPA oder durch Ausdifferenzierung der Zellen aktiviert wird<sup>15</sup>. In den EMSA-Experimenten konnte nun gezeigt werden, dass in den Zelllinien DG75 und P3HR1-16 neben dem generellen Faktor auch ein weiterer Faktor nach Induktion spezifisch an die NFW-Bindestelle band. Da diese Bindestelle vor EBER-2 liegt und dieser Faktor als Aktivator beschrieben wurde, könnte hiermit die Aufrechterhaltung der Transkription von EBER-2 in induzierten Zellen erklärt werden.

Der funktionelle Nachweis für diese Hypothese konnte aber aus zeitlichen Gründen in dieser Arbeit nicht mehr erbracht werden. Durch Mutation der Bindestelle von NFW sollte in einem funktionellen Nachweissystem wie dem *Nuclear Run On*-Experiment die konstante Expression von EBER-2 während der viralen Replikation unterbunden sein. Da der Faktor auch in der EBV-negativen Zelllinie DG75 nachgewiesen wurde, würde man erwarten, dass dieser Nachweis auch in diesen Zellen funktionieren sollte.

**Theorie der Regulation der Expression der EBER-Gene beim Übergang in die Phase der Virusproduktion.** Von den Ergebnissen aus *Nuclear Run On*-, DNase I *in vitro Footprint*-Experimenten und EMSA lässt sich folgendes festhalten:

- im Promotorbereich von EBER-1 und EBER-2 vor der kodierenden Sequenz binden die Transkriptionsfaktoren Sp1 und ATF;
- es wurde kein weiterer Transkriptionsfaktor – weder bekannte Aktivatoren, noch Inhibitoren - vor EBER-1 gefunden (DNase I *in vitro Footprint* und EMSA);
- die Menge an Sp1 im Kern sankt nach 3 Tagen der chemischen Induktion (DNase I *in vitro Footprint*);
- die Expression von EBER-1 sank vergleichbar der von Serin-tRNS (*Nuclear Run On*);
- im Promotorbereich von EBER-2 vor der kodierenden Sequenz band NFW nach chemischer Induktion der Virusproduktion (EMSA);

Ausgehend von diesen Ergebnissen könnte die Regulation der Expression der EBER-Gene beim Übergang von der Latenz in die virale Replikation folgendermaßen ablaufen: In latent infizierten Zellen werden EBER-1 und EBER-2 durch die essentielle Bindung von Sp1 und ATF in deren Promotorbereich stark exprimiert. Diese beiden Faktoren sind ausreichend für die hohe Expression. Bei chemischer Induktion der viralen Replikation sinkt zum einen die Transkriptionsaktivität der Polymerase III allgemein (Serin-tRNS), zum anderen verringert sich die Menge an Sp1 im Kern. Dies führt zur geringeren Expression von EBER-1. Bei EBER-2 wird der Rückgang von Sp1 durch die Bindung von NFW, der erst nach Induktion erscheint,



aufgefangen. Hierdurch kommt es zur Abschaltung von EBER-1, wobei EBER-2 weiter transkribiert wird.

### 4.3 Paradoxon – Modulation der Funktionalität

**Modifikation der EBER-Transkripte beim Übergang von der Latenz in die produktive Virusvermehrung.** Die Experimente zum Nachweis der EBER-Transkripte mittels *Northern Blot* und zur Analyse der transkriptionellen Aktivität der EBER-Gene lieferten auf den ersten Blick widersprüchliche Ergebnisse: Obwohl die Aktivität des EBER-1-Gens beim Übergang von der Latenz in die Virusproduktion nahezu vollständig abgeschaltet wurde, waren die Konzentrationen beider EBER-Transkripte während Latenz und produktiver Phase unverändert. Welchen Sinn konnte es haben, die Transkription einer RNS abzuschalten, wenn die Mengen an dieser RNS auch nach Abschaltung unverändert hoch blieb? Eine Möglichkeit dieses Paradoxon zu erklären, ist die Annahme einer Regulation der Funktion der EBER-Transkripte und einer deutlichen Verlängerung der Halbwertszeit zwischen Latenz und Virusvermehrung. Ein Weg, wie eine RNS in ihrer Funktion reguliert werden könnte, ist eine Modifikation.

Bei der Untersuchung der EBER-Transkripte auf Modifikationen auf Nukleotidebene wurden während der viralen Replikation bei EBER-1 und EBER-2 Basenaustausche im Vergleich zur Latenz gefunden (siehe Abschnitt 3.3.4). Bei tRNS, die den EBER-Transkripten durch die internen Boxen A und B und die Sekundärstruktur am ähnlichsten sind, wird in bestimmten Fällen spezifisch ein Cytosin durch ein Uracil ersetzt. Ob ein entsprechendes *Editing* in die andere Richtung möglich ist, ist nicht bekannt<sup>15</sup>. Der einzige Hinweis auf eine Modifikation ist das unterschiedliche Laufverhalten der Transkripte im *Northern Blot* (siehe Abschnitt 3.3.1). Diese Austausche von Uracil nach Cytosin haben aber vermutlich nur wenig direkten Einfluss auf das beobachtete langsamere Laufverhalten der RNS. Da keine anderen Modifikationen der EBERs wie z.B. das Anhängen von Nukleotiden an das 5'-Ende oder das 3'-Ende nachgewiesen werden konnten, führte dies zu der Schlussfolgerung, dass die Transkripte offensichtlich kovalent modifiziert werden. Solche kovalente Modifikationen wurden bei unterschiedlichsten RNS-Transkripten beschrieben<sup>48</sup>. Die tatsächlich vorkommenden Modifikationen bei den EBER-Transkripten sind aber noch unbekannt.

**Die Lokalisation der EBER-Transkripte nach Induktion der Virusreplikation.** Neben einer Modifikation der EBER-Transkripte kann ein weiterer Mechanismus der Regulation der

Funktion der EBERs und damit auch ein Grund für die Erhöhung der Halbwertszeit der Transkripte in einer unterschiedlichen Lokalisation der Transkripte liegen. Die Arbeitsgruppe um Klein *et al.* beschrieb, dass EBER-1 in der Latenz im Zellkern und EBER-2 in den Nucleoli lokalisiert ist <sup>82</sup>. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass beide EBER-Transkripte bei der Induktion der viralen Replikation vom Zellkern ins Zytoplasma transportiert werden. Der Mechanismus, der die unterschiedliche Lokalisation der Transkripte steuert, ist bislang nicht bekannt. Diese Umlagerung kann indirekt durch Umlagerung von Proteinen, an denen die EBER-Transkripte gebunden sind, geschehen. Es ist auch möglich, dass Faktoren, die die EBER-Transkripte in der Latenz im Zellkern halten, bei Induktion der viralen Replikation wegfallen und somit der Transport ins Zytoplasma veranlasst wird.

Diese Umlagerung könnte auch einen Einfluss auf die Aufgabe der EBER-Transkripte haben. Durch die Umlagerung kommen sie in eine andere Umgebung. Der antivirale Mechanismus über die DAI-Kinase, dem die EBER-Transkripte entgegen arbeiten sollen <sup>10</sup>, könnte erst durch die Umlagerung vom Zellkern ins Zytoplasma beginnen. Dadurch könnte in der Phase der Virusvermehrung der antivirale Mechanismus der DAI-Kinase unterbunden werden. Andererseits ist die antivirale Wirkung der EBER-Transkripte nur für EBER-1 gezeigt, dessen Transkription in der Phase der Virusvermehrung abgeschaltet wird. Zum zweiten wurde auch gezeigt, dass EBV auch ohne EBER-Transkripte dem Interferon-induzierten antivirale Mechanismus über die DAI-Kinase entgegenwirken kann. Die Beteiligung der EBER-Transkripte an diesem Mechanismus ist deswegen, wenn sie auch in der Phase der Virusproduktion in das Zytoplasma transportiert werden, eher unwahrscheinlich.

**Beteiligung von EB-viralen Proteinen an der Lokalisation der EBER-Transkripte.** In EBV-negativen Zellen, die mit EBER-Expressionsplasmiden transfiziert wurden, waren die EBER-Transkripte im Zytoplasma lokalisiert. Dies entsprach nicht der Lokalisation, die die Transkripte in EBV-positiven Zellen hatten. Daher war es denkbar, dass virale Proteine für die Lokalisation der Transkripte im Zellkern verantwortlich waren. In nahezu allen Latenzstufen von EBV werden EBNA-1 und LMP-2A exprimiert. Eine Kotransfektion von EBER-Expressionsplasmid mit Expressionsplasmiden für EBNA-1 und / oder LMP-2A in EBV-negative Zellen zeigte, dass durch Expression von EBNA-1 EBER-2 wieder im Kern, nicht aber im Nukleolus, lokalisiert wird. Auf EBER-1 hatte EBNA-1 keinen Einfluss. Durch Expression von LMP-2A verlagerten sich die Signale von EBER-1 und EBER-2 ebenfalls in den Kern der Zellen und dort bevorzugt, aber nicht vollständig, in die Nucleoli. Durch Expression beider Proteine sank die Expression der EBER-Transkripte stark ab, so dass keine eindeutigen Aussagen mehr getroffen werden konnten.

Die Koexpression der Gene EBNA-1 und LMP-2A zeigte aber, dass EB-virale Gene einen Einfluss auf die Lokalisation der EBER-Transkripte hatten. Die vollständige Lokalisierung wie in EBV-positiven Zellen konnte jedoch nicht wiederhergestellt werden. Vermutlich spielen noch andere Faktoren in die Lokalisation hinein, wie z.B. BART-0/1 oder EBV-induzierte zelluläre Faktoren.

Durch Behandlung der mit EBER-Expressionsplasmiden transfizierten EBV-negativen Zellen mit LMB wurde die Lokalisation der EBER-Transkripte in den Bereichen der EBV-positiven Zellen wiederhergestellt. Daraus ließ sich schließen, dass der Transport vom Kern in das Zytoplasma ein aktiver Prozess war, der durch EBV in Gang gesetzt wurde und die EBER-Transkripte im Kern hielt.

Betrachtete man die Auswirkungen von LMB auf EBV-positive Zellen im Vergleich zu den Auswirkungen auf mit EBER-Expressionsplasmiden transfizierte EBV-negative Zellen, hatte dort die Hemmung der Kernexports durch LMB jedoch keine Auswirkungen auf die Umlagerung der EBER-Transkripte bei Induktion. Diese Unterschiede könnten einerseits darauf hinweisen, dass es in EBV-positiven Zellen neben dem LMB-sensitiven Mechanismus noch wenigstens einen weiteren nicht sensitiven, möglicherweise viralen, Mechanismus gibt, der den Transport der EBER-Transkripte in das Zytoplasma steuert. Während in EBV-negativen Zellen die EBER-Transkripte möglicherweise ausschließlich durch zelluläre Transportwege in Zytoplasma transportiert werden, könnten in EBV-positiven Zellen hingegen EB-virale Proteine diesen Transport übernehmen. Der Transport durch EB-virale Proteine ließe darauf schließen, dass dieser Umlagerung eine wichtige Bedeutung zukommt, welche für den Übergang von der Latenz in die virale Replikation von Bedeutung sein kann.

Zum anderen könnte der Transport in das Zytoplasma allein durch den Wegfall latenter Proteine in der Phase der Virusvermehrung ausgelöst werden und dieser Transport eigentlich der Entsorgung, die wiederum in der produktiven Phase gestört ist, der EBER-Transkripte dienen. Dies würde bedeuten, dass den EBERs im Zytoplasma keine Aufgabe in der Phase der Virusvermehrung von EBV zukommt.

## 4.4 Zusammenfassung

Fraglich bleiben allerdings die Zusammenhänge zwischen

- der Modulation der Funktion der EBER-Transkripte
- der Lokalisation der EBERs im Zellkern und im Zytoplasma
- der Modifikation der EBERs im produktiven Zyklus
- der Verlängerung der Halbwertszeit ?

Das Ziel der Vorgänge sollte die Modulation der Funktion sein, da sonst das Pradoxon aus Abschaltung der Synthese von EBER-1 bei gleichzeitiger Verlängerung der Stabilität nicht erklärt werden kann. Für die Abfolge der einzelnen Schritte und deren Zusammenhang sind mehrere Möglichkeiten denkbar:

- a) - virale Mechanismen regeln die Lokalisation der EBER-Transkripte im Kern
  - virale Kontrolle bricht zusammen und zelluläre Mechanismen bringen die EBERs in das Zytoplasma
  - Aufgrund der Lokalisation im Zytoplasma kommt es zur Funktionslosigkeit der Transkripte und zu einem verzögertem Abbau
  - daraus folgt eine erhöhte Halbwertszeit, wodurch es zu Modifikationen der RNS kommt
- b) - virale Mechanismen regeln die Lokalisation der EBER-Transkripte im Kern
  - virale Mechanismen transportieren die EBERs aktiv in das Zytoplasma
  - Aufgrund der Lokalisation im Zytoplasma kommt es zur Funktionslosigkeit der Transkripte und zu einem verzögertem Abbau
  - daraus folgt eine erhöhte Halbwertszeit, wodurch es zu Modifikationen der RNS kommt
- c) - zelluläre und / oder virale Mechanismen steuern die Modifikation der EBER-Transkripte
  - Aufgrund der Modifikation kommt es zur Umlagerung der EBERs in das Zytoplasma und damit zur Regulation der Funktion
  - Aufgrund der Modifikation wird auch der Abbau gehemmt und die Halbwertszeit erhöht sich

Die Frage danach, welche der Möglichkeiten die richtige ist führt wieder zum Kern der Arbeit, nämlich der Funktion der EBER-Transkripte. Ist es notwendig, dass EBER-1 beim Übergang von der Latenz in die Virusvermehrung abgeschaltet wird? Hat EBER-1 demnach nur in der Latenz eine Funktion bzw. stabilisiert es die Latenz? Die vermehrte Expression des IL-10, das für EBV-positive Zellen wie ein Wachstumsfaktor wirkt spricht durchaus dafür. Außerdem

---

bewirkt IL-10 eine Verschiebung des Verhältnisses  $T_{H1} / T_{H2}$  zugunsten von  $T_{H2}$  und hemmt somit die zelluläre Immunantwort gegen EBV. Andererseits kann die Expression von EBER-1 dem natürlichen Prozess beim *host shut off* zu Opfer fallen (ähnliche Regulation wie Serin-tRNS) und die Aufrechterhaltung der Expression von EBER-2 ist der aktiv geregelte Prozess. Demnach hat EBER-2 sowohl in der Latenz, als auch in der Phase der Virusvermehrung eine Aufgabe. Hat dann die unterschiedliche Lokalisation einen Einfluss auf die Funktion, wie z.B. der Abwehr der Immunantwort? Aus diesen noch offenen Fragen wird deutlich, dass die Rolle der EBER-Transkripte noch weiterer Untersuchungen bedarf.

## 5 Anhang

### Anhang 1: Sequenzen des Bereiches der EBER-Gene von EBV

|                     |                         |   |
|---------------------|-------------------------|---|
|                     | 10 20 30 40 50          | ACTAGTAAGTCTAGAGGGGCCCTAGCAATGTCACAGCTAAATGCCACACAGGGGCACAC |
| B95-8.seq(1>1126)   | →                       | actagtaagtctagagggggcctagcaatgtcacagctaaatgccaccaggggcacac  |
|                     | 60 70 80 90 100 110     | ACTCAAGCGGGGTCTCGGAGCTCCTAGGTCAGACCACGAAAGGTCAGCCTGCAAGGT   |
| B95-8.seq(1>1126)   | →                       | actcaagcgggggtctcggagctcctaggtcagaccacgaaaggtcagcctgcaaggt  |
| RajiS1.Seq(18>676)  | →                       | GTCAGACCACGAAAGGTCAGCCTGCAAGGT                              |
|                     | 120 130 140 150 160 170 | GGATGGCGTGTTTTCTGAGGTTATCCCCGCTACGTGCAGTGCTGGGTGATAGAGACC   |
| B95-8.seq(1>1126)   | →                       | ggatggcgtgTTTTctgaggttatccccgctacgtgcagtgcctgggtgatagagacc  |
| RajiS1.Seq(18>676)  | →                       | GGATGGCGTGTTTTCTGAGGTTATCCCCGCTACGTGCAGTGCTGGGTGATAGAGACC   |
| Akata S1(4>451)     | →                       | AGAGACC   |
|                     | 180 190 200 210 220     | CTAGAATGTGTGCGAAATGACCAAGCGTCCCCGCAGCGGGGCTCC---CAACACGGGT  |
| B95-8.seq(1>1126)   | →                       | ctagaatgtgtcgaatgaccaagcgtccccgcagcggggctcc---caacacgggt    |
| RajiS1.Seq(18>676)  | →                       | CTAGAATGTGTGCGAAATGACCAAGCGTCCCCGCAGCGGGGCTCC---CAACACGGGT  |
| Akata S1(4>451)     | →                       | CTGATGTGTGTGCGAAATGACCAAGCGTCCCCGCAGCGGGGCTCGGAGCAACACGGGT  |
|                     | 230 240 250 260 270 280 | TCCCAGAGAGGGTAAAGAGGGGGCCATAAAGCCCAGGGTGTAACACCGACCGCG      |
| B95-8.seq(1>1126)   | →                       | tcccagagagggtaaaagagggggccataaagcccaggggtgtaaacacccgaccgcg  |
| RajiS1.Seq(18>676)  | →                       | TCCCAGAGAGGGTAAAGAGGGGGCCATAAAGCCCAGGGTGTAACACCGACCGCG      |
| Akata S1(4>451)     | →                       | TCCCAGAGAGGGTAAAGAGGGGGCCATAAAGCCCAGGGTGTAACACCGACCGCG      |
| P3HR1-16 S1(30>530) | →                       | GGGTAAAGAGGGGGGCCATAAAGCCCAGGGTGTAACACCGACCGCG              |
| P3HR1-13 S1(67>592) | →                       | AAGAGGGGGCCATAAAGCCCAGGGTGTAACACCGACCGCG                    |
|                     | 290 300 310 320 330 340 | CCACCAGATGGCACACGTGGGGGAAATGAGGGTTAGCATAGGCAACCCCCGCTTACA   |
| B95-8.seq(1>1126)   | →                       | ccaccagatggcacacgtgggggaaatgagggttagcataggcaacccccgcctaca   |
| RajiS1.Seq(18>676)  | →                       | CCACCAGATGGCACACGTGGGGGAAATGAGGGTTAGCATAGGCAACCCCCGCTTACA   |
| Akata S1(4>451)     | →                       | CCACCAGATGGCACACGTGGGGGAAATGAGGGTTAGCATAGGCAACCCCCGCTTACA   |
| P3HR1-16 S1(30>530) | →                       | CCACCAGATGGCGCACGTGGGGGAAATGAGGGTTAGCATAGGCAACCCCCGCTTACA   |
| P3HR1-13 S1(67>592) | →                       | CCACCAGATGGCRACGTGGGGGAAATGAGGGTTAGCATAGGCAACCCCCGCTTACA    |
|                     | 350 360 370 380 390     | CACCAACTATAGCAAACCCGCCCCGTCACGGTGACGTAGTCTGTCTTGAGGAGATG    |
| B95-8.seq(1>1126)   | →                       | caccaactatagcaaaccgccccgctcacggtgacgtagtctgtcttgaggagatg    |
| RajiS1.Seq(18>676)  | →                       | CACCAACTATAGCAAACCCGCCCCGTCACGGTGACGTAGTCTGTCTTGAGGAGATG    |
| Akata S1(4>451)     | →                       | CACCAACTATGCAAACCCGCCCCGTCACGGTGACGTAGTCTGTCTTGAGGAGATG     |
| P3HR1-16 S1(30>530) | →                       | CACCAACTATAGCAAACCCGCCCCGTCACGGTGACGTAGTCTGTCTTGAGGAGATG    |
| P3HR1-13 S1(67>592) | →                       | CACCAACTATAGCAAACCCGCCCCGTCACGGTGACGTAGTCTGTCTTGAGGAGATG    |
|                     | 400 410 420 430 440 450 | TAGACTTGTAGACACTGCAAAACCTCAGGACCTACGCTGCCCTAGAGGTTTTGCTAG   |
| B95-8.seq(1>1126)   | →                       | tagacttgttagacactgcaaaacctcaggacctacgctgccctagaggttttgctag  |
| RajiS1.Seq(18>676)  | →                       | TAGACTTGTAGACACTGCAAAACCTCAGGACCTACGCTGCCCTAGAGGTTTTGCTAG   |
| Akata S1(4>451)     | →                       | TAGACTTGTAGACACTGCAAAACCTCAGGACCTACGCTGCCCTAGAGGTTTTGCTAG   |



|                        |  |   |     |     |     |     |     |
|------------------------|--|---|-----|-----|-----|-----|-----|
|                        |  | 400   | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 |
|                        |  | TAGACTTGTAGACACTGCAAAACCTCAGGACCTACGCTGCCCTAGAGGTTTTGCTAG     |     |     |     |     |     |
| P3HR1-16 S1 (30>530) → |  | TAGACTTGTAGACACTGCAAAACCTCAGGACCTACGCTGCCCTAGAGGTTTTGCTAG     |     |     |     |     |     |
| P3HR1-13 S1 (67>592) → |  | TAGACTTGTAGACACTGCAAAACCTCAGGACCTACGCTGCCCTAGAGGTTTTGCTAG     |     |     |     |     |     |
|                        |  | 460   | 470 | 480 | 490 | 500 | 510 |
|                        |  | GGAGGAGACGTGTGTGGCTGTAGCCACCCGTCCCGGGTACAAGTCCCGGGTGGTGAG     |     |     |     |     |     |
| B95-8.seq (1>1126) →   |  | ggaggagacgtgtgtggctgttagccacccgtcccggttacaagtcccggtgggtgag    |     |     |     |     |     |
| RajiS1.Seq (18>676) →  |  | GGAGGAGACGTGTGTGGCTGTAGCCACCCGTCCCGGGTACAAGTCCCGGGTGGTGAG     |     |     |     |     |     |
| Akata S1 (4>451) →     |  | GGAGGAGACGTGTGTGGCTGTAGCCACCCGTCCCGGGTACAAGTCCCGGGTGGTGAG     |     |     |     |     |     |
| P3HR1-16 S1 (30>530) → |  | GGAGGAGACGTGTGTGGCTGTAGCCACCCGTCCCGGGTACAAGTCCCGGGTGGTGAG     |     |     |     |     |     |
| P3HR1-13 S1 (67>592) → |  | GGAGGAGACGTGTGTGGCTGTAGCCACCCGTCCCGGGTACAAGTCCCGGGTGGTGAG     |     |     |     |     |     |
|                        |  | 520   | 530 | 540 | 550 | 560 | 570 |
|                        |  | GACGGTGTCTGTGGTTGTCTTCCAGACTCTGCTTTCTGCCGTCTTCGGTCAAGTAC      |     |     |     |     |     |
| B95-8.seq (1>1126) →   |  | gacggtgtctgtggttgtcttcccagactctgctttctgccgtcttcgggtcaagtag    |     |     |     |     |     |
| RajiS1.Seq (18>676) →  |  | GACGGTGTCTGTGGTTGTCTTCCAGACTCTGCTTTCTGCCGTCTTCGGTCAAGTAC      |     |     |     |     |     |
| Akata S1 (4>451) →     |  | GACGGTGTCTGTGGTTGTCTTCCAGACTCTGCTTTCTGCCGTCTTCGGTCAAGTAC      |     |     |     |     |     |
| P3HR1-16 S1 (30>530) → |  | GACGGTGTCTGTGGTTGTCTTCCAGACTCTGCTTTCTGCCGTCTTCGGTCAAGTAC      |     |     |     |     |     |
| P3HR1-13 S1 (67>592) → |  | GACGGTGTCTGTGGTTGTCTTCCAGACTCTGCTTTCTGCCGTCTTCGGTCAAGTAC      |     |     |     |     |     |
|                        |  | 580   | 590 | 600 | 610 | 620 |     |
|                        |  | CAGCTGGTGGTCCGCATGTTTTGATCCAAACTTTWGTTTTAGGATTTATGCATCCAT     |     |     |     |     |     |
| B95-8.seq (1>1126) →   |  | cagctgggtgggtccgcacatgttttgatccaaacttttgttttaggatttatgcatccat |     |     |     |     |     |
| RajiS1.Seq (18>676) →  |  | CAGCTGGTGGTCCGCATGTTTTGATCCAAACTTTTGTTTTAGGATTTATGCATCCAT     |     |     |     |     |     |
| Akata S1 (4>451) →     |  | CAGCTGGTGGTCCGCATGTTTTGATCCAAACTTTAGTTTTAGG                   |     |     |     |     |     |
| P3HR1-16 S1 (30>530) → |  | CAGCTGGTGGTCCGCATGTTTTGATCCAAACTTTAGTTTTTAGGATTTATGCATCCAT    |     |     |     |     |     |
| P3HR1-13 S1 (67>592) → |  | CAGCTGGTGGTCCGCATGTTTTGATCCAAACTTTAGTTTTTAGGATTTATGCATCCAT    |     |     |     |     |     |
| Raji S2 (1>451) →      |  | TTTTGTTTTTAGGATTTATGCATCCAT                                   |     |     |     |     |     |
| P3HR1-13 S2 (17>587) → |  | AT  |     |     |     |     |     |
|                        |  | 630   | 640 | 650 | 660 | 670 | 680 |
|                        |  | TATCCCGCAGTTCCACCTAAACGGGGCTTAACGTTGCATCCCAGAAGATGCACRCKT     |     |     |     |     |     |
| B95-8.seq (1>1126) →   |  | tatcccgagttccacctaataacggggcttaacggttgcacccagaagatgcacgctt    |     |     |     |     |     |
| RajiS1.Seq (18>676) →  |  | TATCCCGCAGTTCCACCTAAACGGGGCTTAACGTTGCATCCCA                   |     |     |     |     |     |
| P3HR1-16 S1 (30>530) → |  | TATCCCGCAGTTCCACCTAAACGGGGCTTAACGTTGCATCCCAGAAGATGCACACGT     |     |     |     |     |     |
| P3HR1-13 S1 (67>592) → |  | TATCCCGCAGTTCCACCTAAACGGGGCTTAACGTTGCATCCCAGAAGATGCACACGT     |     |     |     |     |     |
| Raji S2 (1>451) →      |  | TATCCCGCAGTTCCACCTAAACGGGGCTTAACGTTGCATCCCAGAAGATGCACGCTT     |     |     |     |     |     |
| P3HR1-13 S2 (17>587) → |  | TATCCCGCAGTTCCACCTAAACGGGGCTTAACGTTGCATCCCAGAAGATGCACACGT     |     |     |     |     |     |
| P3HR1-16 S2 (31>573) → |  | CCACCTAAACGGGGCTTAACGTTGCATCCCAGAAGATGCACACGT                 |     |     |     |     |     |
| Akata S2 (130>696) →   |  | CATCCCAGAAGATGCACACGT   |     |     |     |     |     |
|                        |  | 690   | 700 | 710 | 720 | 730 | 740 |
|                        |  | AACCCCGCCTACAACCGTGACGTGCTGTTTACCAGCATGTATAGAGTTACGGTTCA      |     |     |     |     |     |
| B95-8.seq (1>1126) →   |  | aaccgagcctacaacggtgacgtgctggtttaccagcatgtatagagttacggttcg     |     |     |     |     |     |
| P3HR1-16 S1 (30>530) → |  | AACCCCGCCTACAACCGTGA  |     |     |     |     |     |
| P3HR1-13 S1 (67>592) → |  | AACCCCGCCTACAACCGTGACGTGCTGTTTACCAGCATGTATAGAGTTACGGTTCA      |     |     |     |     |     |
| Raji S2 (1>451) →      |  | AACCCCGCCTACAACCGTGACGTGCTGTTTACCAGCATGTATAGAGTTACGGTTCA      |     |     |     |     |     |
| P3HR1-13 S2 (17>587) → |  | AACCCCGCCTACAACCGTGACGTGCTGTTTACCAGCATGTATAGAGTTACGGTTCA      |     |     |     |     |     |
| P3HR1-16 S2 (31>573) → |  | AACCCCGCCTACAACCGTGACGTGCTGTTTACCAGCATGTATAGAGTTACGGTTCA      |     |     |     |     |     |
| Akata S2 (130>696) →   |  | AACCCCGCCTACAACCGTGACGTGCTGTTTACCAGCATGTATAGAGTTACGGTTCA      |     |     |     |     |     |



|                     |   |   |      |      |      |      |      |
|---------------------|---|---|------|------|------|------|------|
|                     |   | 750   | 760  | 770  | 780  | 790  |      |
|                     |   | CTACATCAAACAGGACAGCCGTTGCCCTAGTGGTTTCGGACACACCGCCAACGCTCA   |      |      |      |      |      |
| B95-8.seq(1>1126)   | → | ctacatcaaacaggacagccgttgccttagtggtttcggacacacccgccaacgctca  |      |      |      |      |      |
| P3HR1-13 S1(67>592) | → | CTACATCAAACAGGACAGCCGTTGCC                                  |      |      |      |      |      |
| Raji S2(1>451)      | → | CCACACCAAACAGGACAGCCGTTGCCCTAGTGGTTTCGGACACACCGCCAACGCTCA   |      |      |      |      |      |
| P3HR1-13 S2(17>587) | → | CTACATCAAACAGGACAGCCGTTGCCCTAGTGGTTTCGGACACACCGCCAACGCTCA   |      |      |      |      |      |
| P3HR1-16 S2(31>573) | → | CTACATCAAACAGGACAGCCGTTGCCCTAGTGGTTTCGGACACACCGCCAACGCTCA   |      |      |      |      |      |
| Akata S2(130>696)   | → | CTACATCAAACAGGACAGCCGTTGCCCTAGTGGTTTCGGACACACCGCCAACGCTCA   |      |      |      |      |      |
|                     |   | 800   | 810  | 820  | 830  | 840  | 850  |
|                     |   | GTGCGGTGCTACCGACCCGAGGTCAAGTCCCGGGGAGGAGAAGAGAGGCTTCCCGC    |      |      |      |      |      |
| B95-8.seq(1>1126)   | → | gtgcggtgctaccgacccgaggtcaagtcccggggaggagaagagaggcttcccg     |      |      |      |      |      |
| Raji S2(1>451)      | → | GTGCGGTGCTACCGACCCGAGGTCAAGTCCCGGGGAGGAGAAGAGAGGCTTCCCGC    |      |      |      |      |      |
| P3HR1-13 S2(17>587) | → | GTGCGGTGCTACCGACCCGAGGTCAAGTCCCGGGGAGGAGAAGAGAGGCTTCCCGC    |      |      |      |      |      |
| P3HR1-16 S2(31>573) | → | GTGCGGTGCTACCGACCCGAGGTCAAGTCCCGGGGAGGAGAAGAGAGGCTTCCCGC    |      |      |      |      |      |
| Akata S2(130>696)   | → | GTGCGGTGCTACCGACCCGAGGTCAAGTCCCGGGGAGGAGAAGAGAGGCTTCCCGC    |      |      |      |      |      |
|                     |   | 860   | 870  | 880  | 890  | 900  | 910  |
|                     |   | CTAGAGCATTTGCAAGTCAGGATTCTCTAATCCCTCTGGGAGAAGGGTATTTCGGCTT  |      |      |      |      |      |
| B95-8.seq(1>1126)   | → | ctagagcatttgcagtcaggattctctaataccctctgggagaaggggtatttcggctt |      |      |      |      |      |
| Raji S2(1>451)      | → | CTAGAGCATTTGCAAGTCAGGATTCTCTAATCCCTCTGGGAGAAGGGTATTTCGGCTT  |      |      |      |      |      |
| P3HR1-13 S2(17>587) | → | CTAGAGCATTTGCAAGTCAGGATTCTCTAATCCCTCTGGGAGAAGGGTATTTCGGCTT  |      |      |      |      |      |
| P3HR1-16 S2(31>573) | → | CTAGAGCATCTGCAAGTCAGGATTCTCTAATCCCTCTGGGAGAAGGGTATTTCGGCTT  |      |      |      |      |      |
| Akata S2(130>696)   | → | CTAGAGCATTTGCAAGTCAGGATTCTCTAATCCCTCTGGGAGAAGGGTATTTCGGCTT  |      |      |      |      |      |
|                     |   | 920   | 930  | 940  | 950  | 960  |      |
|                     |   | GTCCGCTG-TTTTTTTGTGGCTAGTTTTGCACCCACAACATGTAAGGGCCCGCTACC   |      |      |      |      |      |
| B95-8.seq(1>1126)   | → | gtccgcta-tttttttgtggctagttttgcaccacacaacatgtaagggcccgctacc  |      |      |      |      |      |
| Raji S2(1>451)      | → | GTCCGCTG-TTTTTTTGTGGCTAGTTTTGCACCCACAACATGTAAGGGCCCGCTACC   |      |      |      |      |      |
| P3HR1-13 S2(17>587) | → | GTCCGCTG-TTTTTTTGTGGCTAGTTTTGCACCCACAACATGTAAGGGCCCGCTACC   |      |      |      |      |      |
| P3HR1-16 S2(31>573) | → | GTCCGCTG-TTTTTTTGTGGCTAGTTTTGCACCCACAACATGTAAGGGCCCGCTACC   |      |      |      |      |      |
| Akata S2(130>696)   | → | GTCCGCTGT-TTTTTTTGTGGCTAGTTTTGCACCCACAACATGTAAGGGCCCGCTACC  |      |      |      |      |      |
|                     |   | 970   | 980  | 990  | 1000 | 1010 | 1020 |
|                     |   | CCTACAACACAAAACAACTATCTCCCTAACCATCCTTTTGCCAATCAATTCTGTG     |      |      |      |      |      |
| B95-8.seq(1>1126)   | → | cctacaacacaaaacaaactatctcccctaaccatccttttgccaatcaattctgtg   |      |      |      |      |      |
| Raji S2(1>451)      | → | CCTACAACACAAAACAACTATCTCCCTAACCATCCTTTTGCCAATCAATTCTGTG     |      |      |      |      |      |
| P3HR1-13 S2(17>587) | → | CCTACAACACAAAACAACTATCTCCAATAACCATCCTTTTGCCAATCAATTCTGTG    |      |      |      |      |      |
| P3HR1-16 S2(31>573) | → | CCTACAACACAAAACAACTATCTCCAATAACCATCCTTTTGCCAATCAATTCTGTG    |      |      |      |      |      |
| Akata S2(130>696)   | → | CCTACAACACAAAACAACTATCTCCCTAACCATCCCTTTTGCCAATCAATTCTGTG    |      |      |      |      |      |
|                     |   | 1030  | 1040 | 1050 | 1060 | 1070 | 1080 |
|                     |   | ACRGGGTTTCTCGGACACCCAGTCTTAGTTCAGGTAGACACCCAGTTATGCAGTGCC   |      |      |      |      |      |
| B95-8.seq(1>1126)   | → | acagggtttcctggacacccagtccttagttcaggtagacacccagttatgcagtgcc  |      |      |      |      |      |
| Raji S2(1>451)      | → | ACAGGGTTTCTCGGACACCCAGT                                     |      |      |      |      |      |
| P3HR1-13 S2(17>587) | → | ACGGGGTTTCTCGGACACCCAGTCTTAGTTCAGGTAGACACCCAGTTATGCAGTGCC   |      |      |      |      |      |
| P3HR1-16 S2(31>573) | → | ACGGGGTTTCTCGGACACCCAGTCTTAGTTCAGGTAGACACCCAGTTATGCAGTGCC   |      |      |      |      |      |
| Akata S2(130>696)   | → | ACAGGGTTTCTCGGACACACAGTCTTAGTTCAGGTAGACACCCAGTTATGCAGTGCC   |      |      |      |      |      |
|                     |   | 1090  | 1100 |      |      |      |      |
|                     |   | ACCAATTCCAA----GCTT   |      |      |      |      |      |
| B95-8.seq(1>1126)   | → | accaattccaa--ccaagctt                                       |      |      |      |      |      |
| P3HR1-13 S2(17>587) | → | ACCAATTCCAA----GCTT   |      |      |      |      |      |
| P3HR1-16 S2(31>573) | → | ACCAATTCCAA----GCTT   |      |      |      |      |      |
| Akata S2(130>696)   | → | ACCAATTCCAA----GCTT   |      |      |      |      |      |



## Anhang 2: Sequenzen der EBER-Transkripte von latentem und induziertem EB-Virus

## EBER-1-RNS-Sequenz aus der Viruslatenz

|                             |   |  |     |     |     |
|-----------------------------|---|--|-----|-----|-----|
|                             |   | 10   | 20  | 30  | 40  |
|                             |   | AGGACCTACGCTGCCCTAGAGGTTTTGCTAGGGAGGAGACGTGTGTGGC  |     |     |     |
| pcRII-1AT7P.abi.SEQ (1>181) | → | AGGACCTACGCTGCCCTAGAGGTTTTGCTAGGGAGGAGACGTGTGTGGC  |     |     |     |
| eber1.SEQ (1>167)           | → | aggacctacgctgccctagaggttttgctagggaggagacgtgtgtggc  |     |     |     |
| pcRII-6AT7P.abi.SEQ (1>128) | → | AGGACCTACGCTGCCCTAGAGGTTTTGCTAGGGAGGAGACGTGTGTGGC  |     |     |     |
|                             |   | 50   | 60  | 70  | 80  |
|                             |   | TGTAGCCACCCGTCCCGGGTACAAGTCCCGGGTGGTGAGGACGGTGTCT  |     |     |     |
| pcRII-1AT7P.abi.SEQ (1>181) | → | TGTAGCCACCCGTCCCGGGTACAAGTCCCGGGTGGTGAGGACGGTGTCT  |     |     |     |
| eber1.SEQ (1>167)           | → | tgtagccacccgtcccgggtacaagtcccgggtggtgaggacgggtgtct |     |     |     |
| pcRII-6AT7P.abi.SEQ (1>128) | → | TGTAGCCACCCGTCCCGGGTACAAGTCCCGGGTGGTGAGGACGGTGTCT  |     |     |     |
|                             |   | 100  | 110 | 120 | 130 |
|                             |   | GTGGTtgtcttcccAgActctgctttctgccgtcttcgggtcAAgtAccA |     |     |     |
| pcRII-1AT7P.abi.SEQ (1>181) | → | GTGGTtGTCTTCCAGACTCTGCTTCTGCCGTCTTCGGTCAAGTACCA    |     |     |     |
| eber1.SEQ (1>167)           | → | gtgggtgtcttcccagactctgctttctgccgtcttcgggtcaagtacca |     |     |     |
| pcRII-6AT7P.abi.SEQ (1>128) | → | GTGG-----A-A-----AA--A--A                          |     |     |     |
|                             |   | 150  | 160 | 170 | 180 |
|                             |   | gctggtggtccgcATGTTdAAAAAAAAAAAAAAAA                |     |     |     |
| pcRII-1AT7P.abi.SEQ (1>181) | → | GCTGGTGGTCCGCATGTTGAAAAAAAAAAAAAAAA                |     |     |     |
| eber1.SEQ (1>167)           | → | gctggtggtccgcatttt                                 |     |     |     |
| pcRII-6AT7P.abi.SEQ (1>128) | → | -----A-----AAAAAAAAAAAAAAAA                        |     |     |     |

## EBER-1-RNS-Sequenz nach Induktion der Virusvermehrung

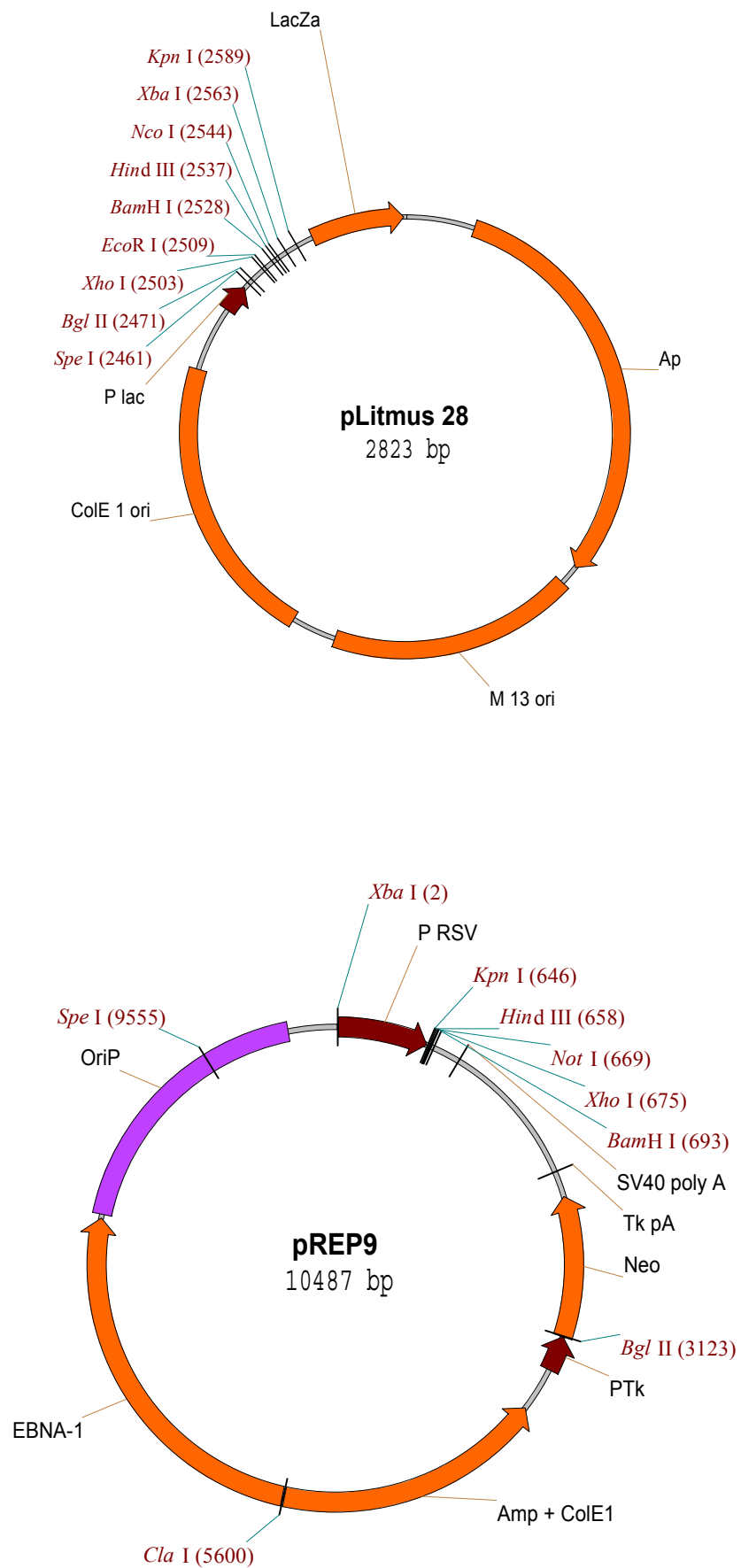
|                                     |   |  |
|-------------------------------------|---|--|
|                                     |   | 10203040                                   |
|                                     |   | AGGACCTACGCTGCCCTAGAGGTTTTGCTAGGGAGGAGAC   |
| NG3.abi.Seq(1>267)                  | → | AGGACCTACGCTGCCCTAGAGGTTTTGCTAGGGAGGAGAC   |
| NG1.abi.Seq(4>266)                  | → | AGGACCTACGCTGCCCTAGAGGTTTTGCTAGGGAGGAGAC   |
| NG10.abi.Seq(3>415)                 | → | AGGACCTACGCTGCCCTAGAGGTTTTGCTAGGGAGGAGAC   |
| pcRII-1Y-2_18092000.abi.SEQ(1>195)  | → | AGGACCTACGCTGCCCTAGAGGTTTTGCTAGGGAGGAGAC   |
| eber1.SEQ(1>167)                    | → | aggacctacgctgccctagagggttttgcaggaggaggagac |
| pcRII-1Y-9_18092000.abi.SEQ(1>195)  | → | AGGACCTACGCTGCCCTAGAGGTTTTGCTAGGGAGGAGAC   |
| pcRII-1Y-10_18092000.abi.SEQ(1>140) | ← | AGGACCTACGCTGCCCTAGAGGTTTTGCTAGGGAGGAGAC   |
|                                     |   | 50607080                                   |
|                                     |   | GTGTGTGGCTGTAGCCACCCGTCCCGGGTACAAGTCCCGG   |
| NG3.abi.Seq(1>267)                  | → | GTGTGTGGCTGTAGCCACCCGTCCCGGGTACAAGTCCCGG   |
| NG1.abi.Seq(4>266)                  | → | GTGTGTGGCTGTAGCCACCCGTCCCGGGTACAAGTCCCGG   |
| NG10.abi.Seq(3>415)                 | → | GTGTGTGGCTGTAGCCACCCGTCCCGGGTACAAGTCCCGG   |
| pcRII-1Y-2_18092000.abi.SEQ(1>195)  | → | GTGTGTGGCTGTAGCCACCCGTCCCGGGTACAAGTCCCGG   |
| eber1.SEQ(1>167)                    | → | gtgtgtggctgtagccacccgtcccggtacaagtcccg     |
| pcRII-1Y-9_18092000.abi.SEQ(1>195)  | → | GTGTGTGGCTGTAGCCACCCGTCCCGGGTACAAGTCCCGG   |
| pcRII-1Y-10_18092000.abi.SEQ(1>140) | ← | GTGTGTGGCTGTAGCCACCCGTCCCGGGTACAAGTCCCGG   |
|                                     |   | 90100110120                                |
|                                     |   | GTGGTGAGGACGGTGTCTGTGGTTGTCTTCCAGACTCTG    |
| NG3.abi.Seq(1>267)                  | → | GTGGTGAGGACGGTGTCTGTGGTTGTCTTCCAGACTCTG    |
| NG1.abi.Seq(4>266)                  | → | GTGGTGAGGACGGTGTCTGTGGTTGTCTTCCAGACTCTG    |
| NG10.abi.Seq(3>415)                 | → | GTGGTGAGGACGGTGTCTGTGGTTGTCTTCCAGACTCTG    |
| pcRII-1Y-2_18092000.abi.SEQ(1>195)  | → | GTGGTGAGGACGGTGTCTGTGGTTGTCTTCCAGACTCTG    |
| eber1.SEQ(1>167)                    | → | gtggtgaggacggtgtctgtggttgtcttccagactctg    |
| pcRII-1Y-9_18092000.abi.SEQ(1>195)  | → | GTGGTGAGGACGGTGTCTGTGGTTGTCTTCCAGACTCTG    |
| pcRII-1Y-10_18092000.abi.SEQ(1>140) | ← | GTGGTGAGGACGGTGTCTGTGGTTGTCTTCCAGACTCTG    |
|                                     |   | 130140150160                               |
|                                     |   | CTTTCTGCCGTCTTCGGTCAAGTACCAGCTGGTGGTCCGC   |
| NG3.abi.Seq(1>267)                  | → | CTTTCTGCCGTCTTCGGTCAAGTACCAGCTGGTGGTCCGC   |
| NG1.abi.Seq(4>266)                  | → | CTTTCTGCCGTCTTCGGTCAAGTACCAGCTGGTGGTCCGC   |
| NG10.abi.Seq(3>415)                 | → | CTTTCTGCCGTCTTCGGTCAAGTACCAGCTGGTGGTCCGC   |
| pcRII-1Y-2_18092000.abi.SEQ(1>195)  | → | CTTTCTGCCGTCTTCGGTCAAGTACCAGCTGGTGGTCCGC   |
| eber1.SEQ(1>167)                    | → | ctttctgccgtcttcggtcaagtaccagctggtggtccgc   |
| pcRII-1Y-9_18092000.abi.SEQ(1>195)  | → | CTTTCTGCCGTCTTCGGTCAAGTACCAGCTGGTGGTCCGC   |
| pcRII-1Y-10_18092000.abi.SEQ(1>140) | ← | CTTTCTGCCGTCTTCGGTCAAGTACCAGCTGGTGGTCCGC   |
|                                     |   | 170180190                                  |
|                                     |   | ATGTTy-C-AAAAAAAAA---AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  |
| NG3.abi.Seq(1>267)                  | → | ATGTTT-T-AAAAAAAAAAGTAAAAAAAAAAAAAAAAANA   |
| NG1.abi.Seq(4>266)                  | → | ATGTTN-C-AAAAAAAAA---AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  |
| NG10.abi.Seq(3>415)                 | → | ATGTG-C-AAAAAAAAA---AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA   |
| pcRII-1Y-2_18092000.abi.SEQ(1>195)  | → | ATGTT-C-AAAA-----AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA      |
| eber1.SEQ(1>167)                    | → | atgttt-t                                   |
| pcRII-1Y-9_18092000.abi.SEQ(1>195)  | → | ATGTGCAC-TAAAAAAAAA---AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA |
| pcRII-1Y-10_18092000.abi.SEQ(1>140) | ← | -----AAAAAAAAA---AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA      |

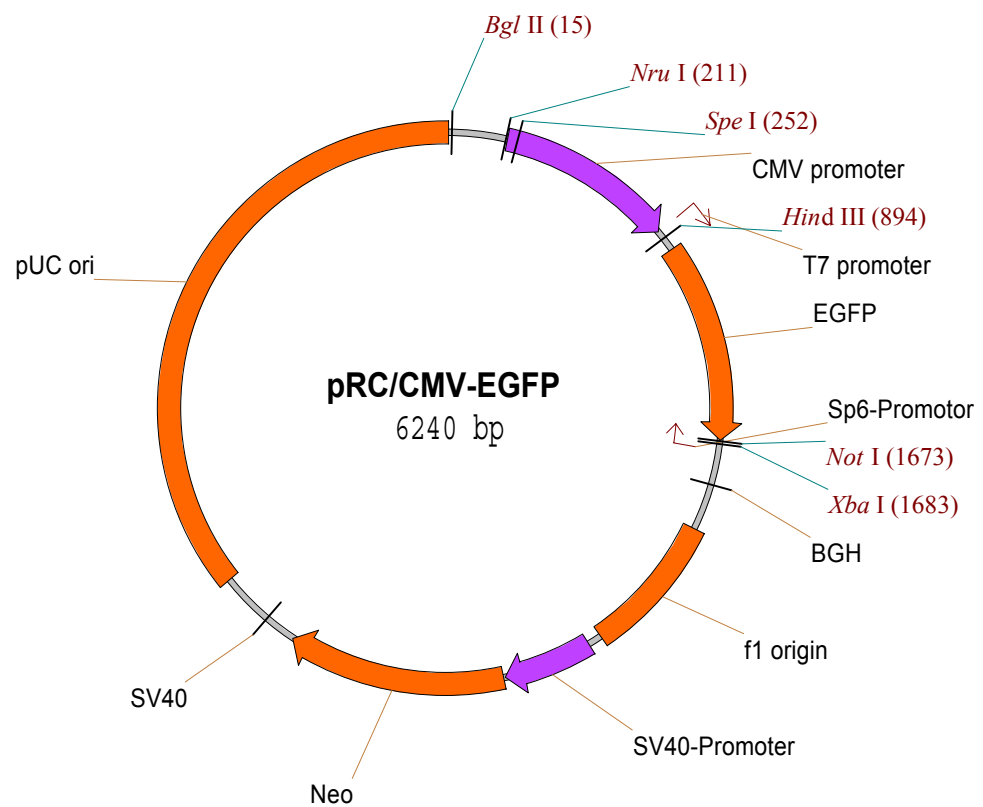
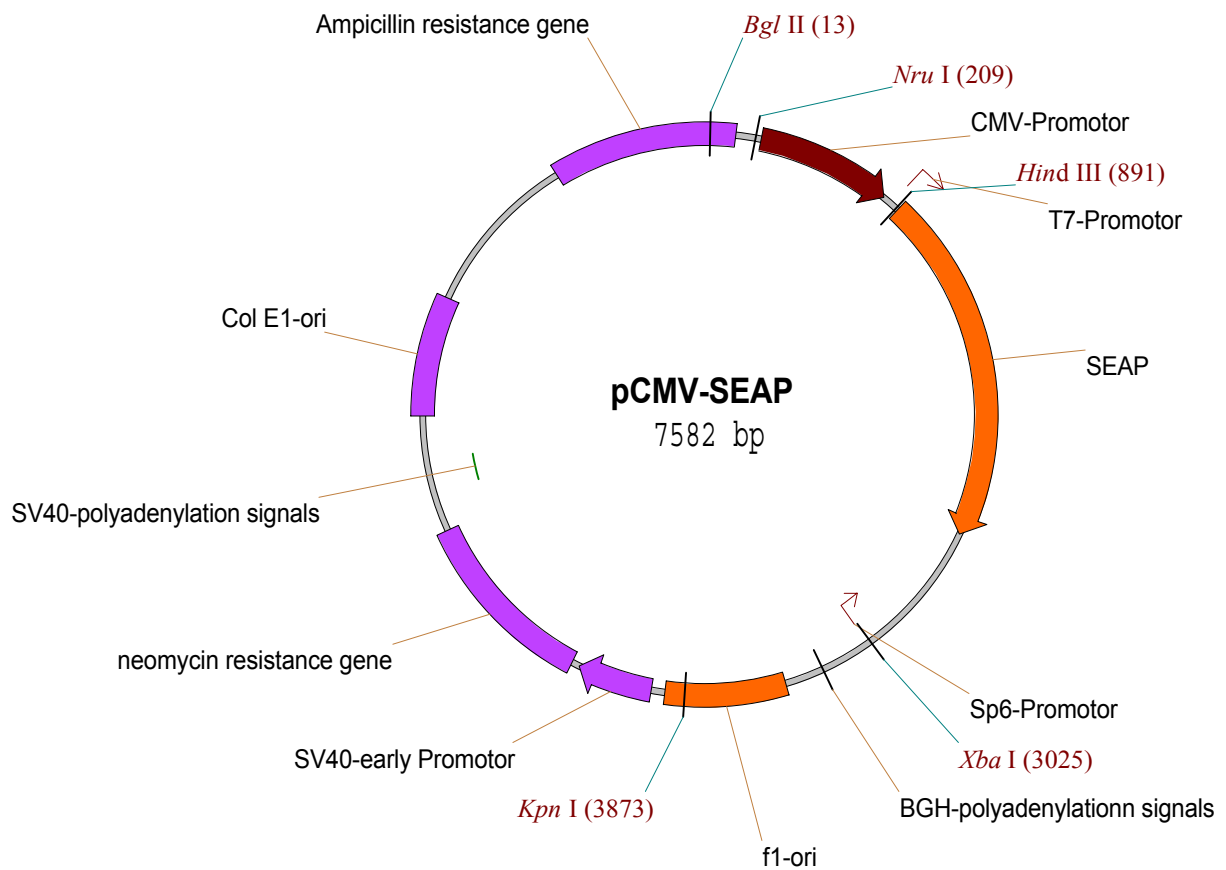


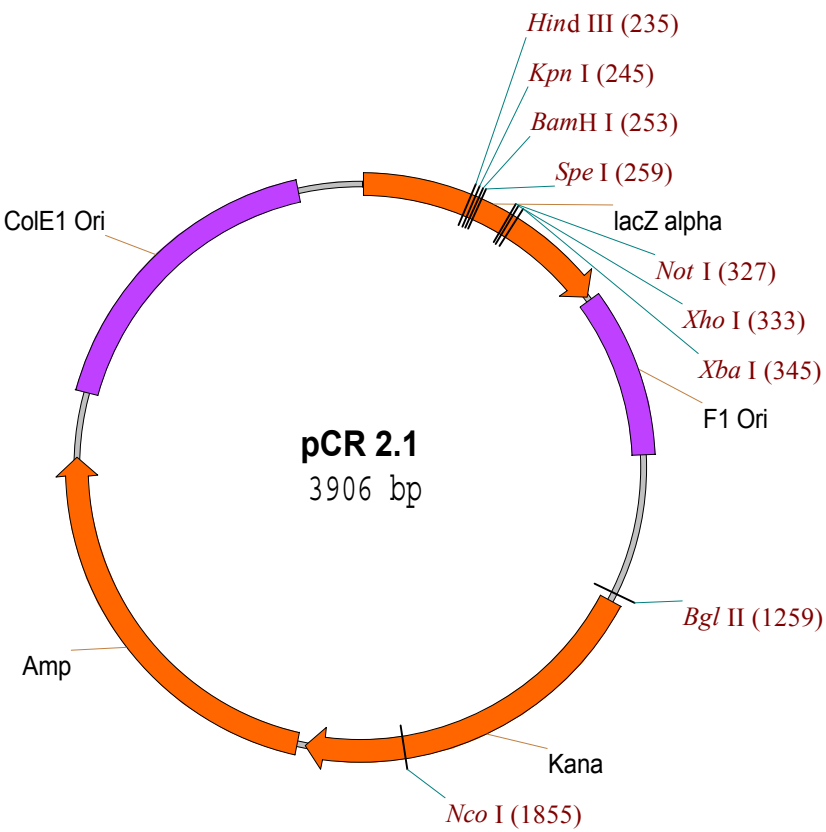
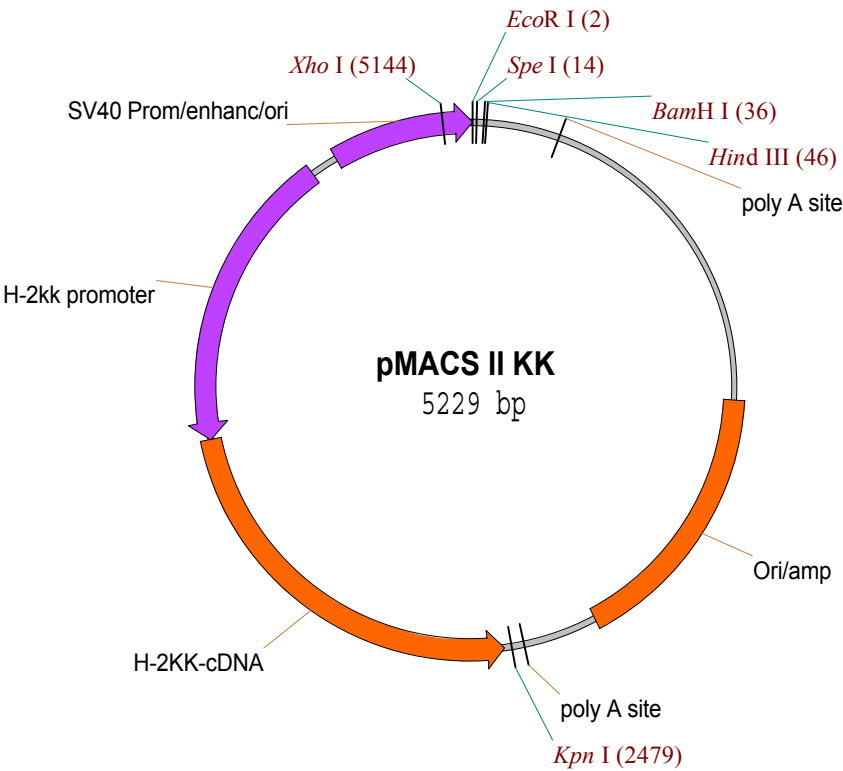
## EBER-2-RNS-Sequenz nach Induktion der Virusvermehrung

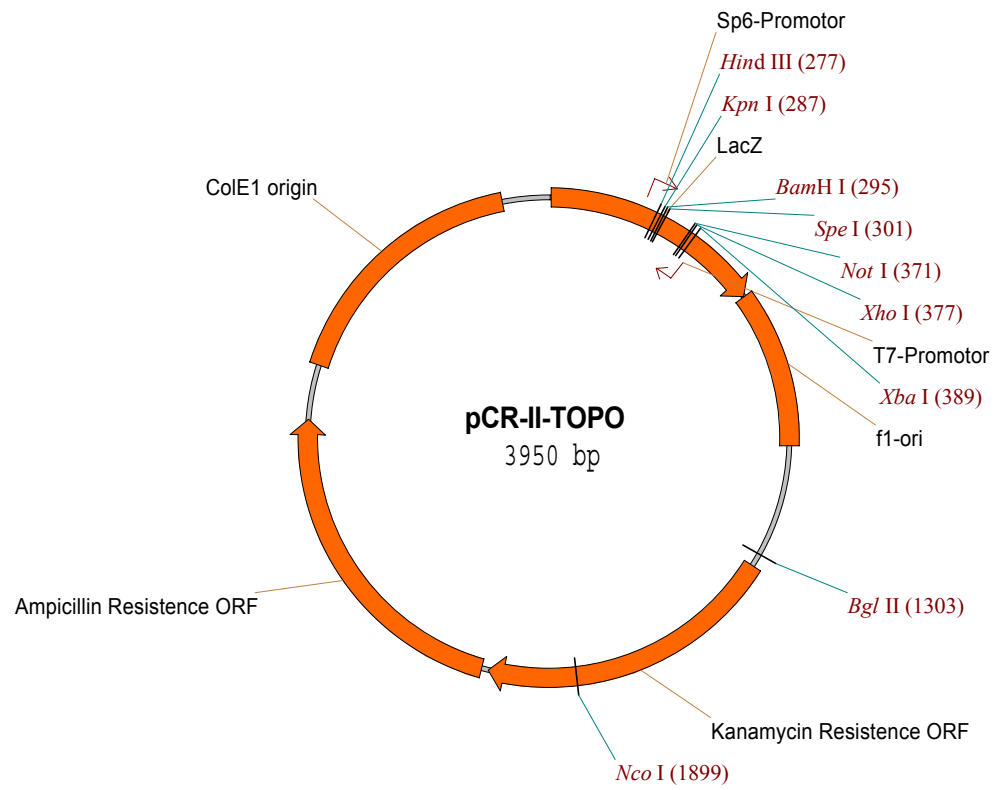
|                   |   |   |     |     |     |     |     |
|-------------------|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|
|                   |   | 10  | 20  | 30  | 40  | 50  | 60  |
|                   |   | AGGACAGCCGTTGCCCTAGTGGTTTCGGACACACCGCCAACGCTCAGTGC GGTGCTACCG                 |     |     |     |     |     |
| NG13.abi (1>463)  | → | AGGACAGCCGTTGCCCTAGTGGTTTCGGACACACCGCCAACGCTCAGTGC GGTGCTACCG                 |     |     |     |     |     |
| NG12.abi (1>271)  | → | AGGACAGCCGTTGCCCTAGTGGTTTCGGACACACCGCCAACGCTCAGTGC GGTGCTACCG                 |     |     |     |     |     |
| NG18.abi (3>266)  | → | AGGACAGCCGTTGCCCTAGTGGTTTCGGACACACCGCCAACGCTCAGTGC GGTGCTACCG                 |     |     |     |     |     |
| NG11.abi (1>470)  | → | AGGACAGCCGTTGCCCTAGTGGTTTCGGACACACCGCCAACGCTCAGTGC GGTGCTACCG                 |     |     |     |     |     |
| NG19.abi (9>672)  | → | AGGACAGCCGTTGCCCTAGTGGTTTCGGACACACCGCCAACGCTCAGTGC GGTGCTACCG                 |     |     |     |     |     |
| NG16.abi (10>762) | → | AGGACAGCCGTTGCCCTAGTGGTTTCGGACACACCGCCAACGCTCAGTGC GGTGCTACCG                 |     |     |     |     |     |
| NG15.abi (13>463) | → | AGGACAGCCGTTGCCCTAGTGGTTTCGGACACACCGCCAACGCTCAGTGC GGTGCTACCG                 |     |     |     |     |     |
| NG14.abi (11>265) | → | AGGACAGCCGTTGCCCTAGTGGTTTCGGACACACCGCCAACGCTCAGTGC GGTGCTACCG                 |     |     |     |     |     |
| NG20.abi (12>242) | → | AGGACAGCCGTTGCCCTAGTGGTTTCGGACACACCGCCAACGCTCAGTGC GGTGCTACCG                 |     |     |     |     |     |
| NG17.abi (26>245) | → | AGGACAGCCGTTGCCCTAGTGGTTTCGGACACACCGCCAACGCTCAGTGC GGTGCTACCG                 |     |     |     |     |     |
| eber2.SEQ (1>175) | → | aggacagccgttgccctagtggtttcggacacacccgccaacgctcagtgc ggtgctaccg                |     |     |     |     |     |
|                   |   | 70  | 80  | 90  | 100 | 110 | 120 |
|                   |   | ACCCGAGGTCAAGTCCCGGGGAGGAGAAGAGAGGCTTCCCGCCTAGAGCATTTGCAAGT                   |     |     |     |     |     |
| NG13.abi (1>463)  | → | ACCCGAGGTCAAGTCCCGGGGAGGAGAAGAGAGGCTTCCCGCCTAGAGCATTTGCAAGT                   |     |     |     |     |     |
| NG12.abi (1>271)  | → | ACCCGAGGTCAAGTCCCGGGGAGGAGAAGAGAGGCTTCCCGCCTAGAGCATTTGCAAGT                   |     |     |     |     |     |
| NG18.abi (3>266)  | → | ACCCGAGGTCAAGTCCCGGGGAGGAGAAGAGAGGCTTCCCGCCTAGAGCATTTGCAAGT                   |     |     |     |     |     |
| NG11.abi (1>470)  | → | ACCCGAGGTCAAGTCCCGGGGAGGAGAAGAGAGGCTTCCCGCCTAGAGCATTTGCAAGT                   |     |     |     |     |     |
| NG19.abi (9>672)  | → | ACCCGAGGTCAAGTCCCGGGGAGGAGAAGAGAGGCTTCCCGCCTAGAGCATTTGCAAGT                   |     |     |     |     |     |
| NG16.abi (10>762) | → | ACCCGAGGTCAAGTCCCGGGGAGGAGAAGAGAGGCTTCCCGCCTAGAGCATTTGCAAGT                   |     |     |     |     |     |
| NG15.abi (13>463) | → | ACCCGAGGTCAAGTCCCGGGGAGGAGAAGAGAGGCTTCCCGCCTAGAGCATTTGCAAGT                   |     |     |     |     |     |
| NG14.abi (11>265) | → | ACCCGAGGTCAAGTCCCGGGGAGGAGAAGAGAGGCTTCCCGCCTAGAGCATTTGCAAGT                   |     |     |     |     |     |
| NG20.abi (12>242) | → | ACCCGAGGTCAAGTCCCGGGGAGGAGAAGAGAGGCTTCCCGCCTAGAGCATTTGCAAGT                   |     |     |     |     |     |
| NG17.abi (26>245) | → | ACCCGAGGTCAAGTCCCGGGGAGGAGAAGAGAGGCTTCCCGCCTAGAGCATTTGCAAGT                   |     |     |     |     |     |
| eber2.SEQ (1>175) | → | acccgaggtcaagtcccggggaggagaagagaggcttcccgccctagagcatttgcaagt                  |     |     |     |     |     |
|                   |   | 130   | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
|                   |   | CAGGATTCTCTAATCCCTCTGGGAGAAGGGTATTTCGGCTTGTC CGCTGTTT <del>W</del> --aAAAAA   |     |     |     |     |     |
| NG13.abi (1>463)  | → | CAGGATTCTCTAATCCCTCTGGGAGAAGGGTATTTCGGCTTGTC CGCTGTTT <del>A</del> --AAAAA    |     |     |     |     |     |
| NG12.abi (1>271)  | → | CAGGATTCTCTAATCCCTCTGGGAGAAGGGTATTTCGGCTTGTC CGCTGTTT <del>ANNAC</del> ----   |     |     |     |     |     |
| NG18.abi (3>266)  | → | CAGGATTCTCTAATCCCTCTGGGAGAAGGGTATTTCGGCTTGTC CGCTGTTT <del>N</del> ----AAAA   |     |     |     |     |     |
| NG11.abi (1>470)  | → | CAGGATTCTCTAATCCCTCTGGGAGAAGGGTATTTCGGCTTGTC CGCTGTTT <del>CGAAAA</del> AAAAA |     |     |     |     |     |
| NG19.abi (9>672)  | → | CAGGATTCTCTAATCCCTCTGGGAGAAGGGTATTTCGGCTTGTC CGCTGTTT <del>TA</del> --AAAAA   |     |     |     |     |     |
| NG16.abi (10>762) | → | CAGGATTCTCTAATCCCTCTGGGAGAAGGGTATTTCGGCTTGTC CGCTGTTT <del>T</del> --ACAAAA   |     |     |     |     |     |
| NG15.abi (13>463) | → | CAGGATTCTCTAATCCCTCTGGGAGAAGGGTATTTCGGCTTGTC CGCTGTTT <del>T</del> --AAAAA    |     |     |     |     |     |
| NG14.abi (11>265) | → | CAGGATTCTCTAATCCCTCTGGGAGAAGGGTATTTCGGCTTGTC CGCTGTTT <del>NN</del> -----AA   |     |     |     |     |     |
| NG20.abi (12>242) | → | CAGGATTCTCTAATCCCTCTGGGAGAAGGGTATTTCGGCTTGTC CGCTGTTT <del>A</del> --AAAAA    |     |     |     |     |     |
| NG17.abi (26>245) | → | CAGGATTCTCTAATCCCTCTGGGAGAAGGGTATTTCGGCTTGTC CGCTGTTT <del>CANN</del> AAA     |     |     |     |     |     |
| eber2.SEQ (1>175) | → | caggattctctaataccctctgggagaagggtatttcggcttggtccgctgattttttt                   |     |     |     |     |     |
|                   |   | 190   | 200 |     |     |     |     |
|                   |   | AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA   |     |     |     |     |     |
| NG13.abi (1>463)  | → | AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA   |     |     |     |     |     |
| NG12.abi (1>271)  | → | AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA   |     |     |     |     |     |
| NG18.abi (3>266)  | → | AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA   |     |     |     |     |     |
| NG11.abi (1>470)  | → | AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA   |     |     |     |     |     |
| NG19.abi (9>672)  | → | AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA   |     |     |     |     |     |
| NG16.abi (10>762) | → | AAAA <del>G</del> AAAAAN-AAAAAAAAAAAAA  |     |     |     |     |     |
| NG15.abi (13>463) | → | AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA   |     |     |     |     |     |
| NG14.abi (11>265) | → | AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA   |     |     |     |     |     |
| NG20.abi (12>242) | → | TA  |     |     |     |     |     |

## Anhang 3: Ausgangsplasmide









## 6 Literaturverzeichnis

1. **Ambinder, R. F., W. A. Shah, D. R. Rawlins, G. S. Hayward, and S. D. Hayward.** 1990. Definition of the sequence requirements for binding of the EBNA-1 protein to its palindromic target sites in Epstein-Barr virus DNA. *J. Virol.* **64**:2369-2379.
2. **Arrand, J. R., L. Rymo, J. E. Walsh, E. Bjorck, T. Lindahl, and B. E. Griffin.** 1981. Molecular cloning of the complete Epstein-Barr virus genome as a set of overlapping restriction endonuclease fragments. *Nucleic Acids Res.* **9**:2999-3014.
3. **Baer, R., A. T. Bankier, M. D. Biggin, P. L. Deininger, P. J. Farrell, T. J. Gibson, G. Hatfull, G. S. Hudson, G. C. Satchwell, C. Seguin, P. S. Tuffnell, and B. G. Barrell.** 1984. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* **310**:207-211.
4. **Bauer, G., P. Hofler, and H. zur Hausen.** 1982. Epstein-Barr virus induction by a serum factor. I. Induction and cooperation with additional inducers. *Virology* **121**:184-194.
5. **Bayliss, G. J. and H. Wolf.** 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**:7162-7165.
6. **Becker, J., U. Leser, M. Marschall, A. Langford, W. Jilg, H. Gelderblom, P. Reichart, and H. Wolf.** 1991. Expression of proteins encoded by Epstein-Barr virus trans- activator genes depends on the differentiation of epithelial cells in oral hairy leukoplakia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:8332-8336.
7. **Burkhardt, A. L., J. B. Bolen, E. Kieff, and R. Longnecker.** 1992. An Epstein-Barr virus transformation-associated membrane protein interacts with src family tyrosine kinases. *J. Virol.* **66**:5161-5167.
8. **Chen, F., J. Z. Zou, L. di Renzo, G. Winberg, L. F. Hu, E. Klein, G. Klein, and I. Ernberg.** 1995. A subpopulation of normal B cells latently infected with Epstein-Barr virus resembles Burkitt lymphoma cells in expressing EBNA-1 but not EBNA-2 or LMP1. *J. Virol.* **69**:3752-3758.
9. **Chen, H. L., M. M. Lung, J. S. Sham, D. T. Choy, B. E. Griffin, and M. H. Ng.** 1992. Transcription of BamHI-A region of the EBV genome in NPC tissues and B cells. *Virology* **191**:193-201.
10. **Clarke, P. A., M. Schwemmle, J. Schickinger, K. Hilse, and M. J. Clemens.** 1991. Binding of Epstein-Barr virus small RNA EBER-1 to the double- stranded RNA-activated protein kinase DAI. *Nucleic. Acids. Res.* **19**:243-248.
11. **Clarke, P. A., N. A. Sharp, and M. J. Clemens.** 1992. Expression of genes for the Epstein-Barr virus small RNAs EBER-1 and EBER-2 in Daudi Burkitt's lymphoma cells: effects of interferon treatment. *J. Gen. Virol.* **73**:3169-3175.
12. **Countryman, J., H. Jenson, R. Seibl, H. Wolf, and G. Miller.** 1987. Polymorphic proteins encoded within BZLF1 of defective and standard Epstein-Barr viruses disrupt latency. *J. Virol.* **61**:3672-3679.
13. **Cox, M. A., J. Leahy, and J. M. Hardwick.** 1990. An enhancer within the divergent promoter of Epstein-Barr virus responds synergistically to the R and Z transactivators. *J.* **64**:313-321.
14. **Deinhardt, F. and H. Wolf.** 1978. Similarities and differences between various herpesviruses: a review. *IARC Sci. Publ.* 169-175.
15. **Dorn, A., C. Benoist, and D. Mathis.** 1989. New B-lymphocyte-specific enhancer-binding protein. *Mol. Cell Biol.* **9**:312-320.
16. **Dosch, H. M., P. Lam, M. F. Hui, T. Hibi, and R. K. Cheung.** 1990. EBV utilizes a unique activation pathway for the transformation of human B cells. *Int. Immunol.* **2**:833-848.



17. **Epstein, M. A. and Y. M. Barr.** 1964. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* **1**:702-703.
18. **Flemington, E. and S. Speck.** 1990. Identification of phorbol ester response elements in the promoter of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *J. Virol.* **64**:1217-1226.
19. **Flemington, E. and S. H. Speck .** 1990. Autoregulation of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *J. Virol.* **64**:1227-1232.
20. **Fowlkes, D. M. and T. Shenk.** 1980. Transcriptional control regions of the adenovirus VAI RNA gene. *Cell* **22**:405-413.
21. **Frade, R., M. Barel, B. Ehlin Henriksson, and G. Klein.** 1985. gp140, the C3d receptor of human B lymphocytes, is also the Epstein-Barr virus receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**:1490-1493.
22. **Furlong, D., H. Swift, and B. Roizman.** 1972. Arrangement of herpesvirus deoxyribonucleic acid in the core. *J. Virol.* **10**:1071-1074.
23. **Futscher, B. W., L. L. Blake, J. H. Gerlach, T. M. Grogan, and W. S. Dalton.** 1993. Quantitative polymerase chain reaction analysis of *mdr1* mRNA in multiple myeloma cell lines and clinical specimens. *Anal. Biochem.* **213**:414-421.
24. **Geiduschek, E. P. and G. P. Tocchini-Valentini.** 1988. Transcription by RNA polymerase III. *Annu. Rev. Biochem.* **57**:873-914.
25. **Glaser, S. L., R. F. Ambinder, J. A. DiGiuseppe, P. L. Horn-Ross, and J. L. Hsu.** 1998. Absence of Epstein-Barr virus EBER-1 transcripts in an epidemiologically diverse group of breast cancers. *Int. J. Cancer* **75**:555-558.
26. **Gregory, C. D., C. Dive, S. Henderson, C. A. Smith, G. T. Williams, J. Gordon, and A. B. Rickinson.** 1991. Activation of Epstein-Barr virus latent genes protects human B cells from death by apoptosis. *Nature* **349**:612-614.
27. **Greifenegger, N., M. Jager, L. A. Kunz-Schughart, H. Wolf, and F. Schwarzmann.** 1998. Epstein-Barr virus small RNA (EBER) genes: differential regulation during lytic viral replication. *J. Virol.* **72**:9323-9328.
28. **Hammerschmidt, W. and B. Sugden.** 1989. Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature* **340**:393-397.
29. **Hardwick, J. M., P. M. Lieberman, and S. D. Hayward.** 1988. A new Epstein-Barr virus transactivator, R, induces expression of a cytoplasmic early antigen. *J. Virol.* **62**:2274-2284.
30. **Henderson, S., M. Rowe, C. Gregory, D. Croom Carter, F. Wang, R. Longnecker, E. Kieff, and A. Rickinson.** 1991. Induction of *bcl-2* expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* **65**:1107-1115.
31. **Henkel, T., P. D. Ling, S. D. Hayward, and M. G. Peterson.** 1994. Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. *Science* **265**:92-95.
32. **Henle, G. and W. Henle.** 1966. Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J.* **91**:1248-1256.
33. **Henle, G., W. Henle, and V. Diehl.** 1968. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **59**:94-101.
34. **Howe, J. G. and M.-D. Shu.** 1989. Epstein-Barr virus small RNA (EBER) genes: Unique transcription units that combine RNA polymerase II and III promoter elements. *Cell* **57**:825-834.
35. **Howe, J. G. and J. A. Steitz.** 1986. Localization of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**:9006-9010.

36. **Hurley, E. A. and D. A. Thorley-Lawson.** 1988. B cell activation and the establishment of Epstein-Barr virus latency. *J. Exp. Med.* **168**:2059-2075.
37. **Johannsen, E., E. Koh, G. Mosialos, X. Tong, E. Kieff, and S. R. Grossman.** 1995. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 transactivation of the latent membrane protein 1 promoter is mediated by J kappa and PU.1. *J. Virol.* **69**:253-262.
38. **Kempkes, B., D. Pich, R. Zeidler, B. Sugden, and W. Hammerschmidt.** 1995. immortalization of human B lymphocytes by a plasmid containing 71 kilobase pairs of Epstein-Barr virus DNA. *J Virol* **69**:231-238.
39. **Kempkes, B., D. Spitkovsky, P. Jansen Durr, J. W. Ellwart, E. Kremmer, H. J. Delecluse, C. Rottenberger, G. W. Bornkamm, and W. Hammerschmidt.** 1995. B-cell proliferation and induction of early G1-regulating proteins by Epstein-Barr virus mutants conditional for EBNA2. *EMBO J.* **14**:88-96.
40. **Kenney, S., E. Holley Guthrie, E. C. Mar, and M. Smith.** 1989. The Epstein-Barr virus BMLF1 promoter contains an enhancer element that is responsive to the BZLF1 and BRLF1 transactivators. *J. Virol.* **63**:3878-3883.
41. **Kenney, S., J. Kamine, E. Holley Guthrie, J. C. Lin, E. C. Mar, and J. Pagano.** 1989. The Epstein-Barr virus (EBV) BZLF1 immediate-early gene product differentially affects latent versus productive EBV promoters. *J. Virol.* **63**:1729-1736.
42. **Kieff, E. and D. Liebowitz.** 1990. Epstein-Barr virus and its replication, p. 1889-1920. *In* B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (eds.), *Fields Virology*. Raven Press, New York.
43. **Kitagawa, N., M. Goto, K. Kurozumi, S. Maruo, M. Fukayama, T. Naoe, M. Yasukawa, K. Hino, T. Suzuki, S. Todo, and K. Takada.** 2000. Epstein-Barr virus-encoded poly(A)(-) RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction. *EMBO J.* **19**:6742-6750.
44. **Komano, J., M. Sugiura, and K. Takada.** 1998. Epstein-Barr virus contributes to the malignant phenotype and to apoptosis resistance in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J. Virol.* **72**:9150-9156.
45. **Laux, G., M. Perricaudet, and P. J. Farrell.** 1988. A spliced Epstein-Barr virus gene expressed in immortalized lymphocytes is created by circularization of the linear viral genome. *EMBO J.* **7**:769-774.
46. **Lerner, M. R., N. C. Andrews, G. Miller, and J. A. Steitz.** 1981. Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**:805-809.
47. **Liebowitz, D., J. Mannick, K. Takada, and E. Kieff.** 1992. Phenotypes of Epstein-Barr virus LMP1 deletion mutants indicate transmembrane and amino-terminal cytoplasmic domains necessary for effects in B-lymphoma cells. *J. Virol.* **66**:4612-4616.
48. **Limbach, P. A., P. F. Crain, and J. A. McCloskey.** 1994. Summary: the modified nucleosides of RNA. *Nucleic Acids Res.* **22**:2183-2196.
49. **Longnecker, R., B. Druker, T. M. Roberts, and E. Kieff.** 1991. An Epstein-Barr virus protein associated with cell growth transformation interacts with a tyrosine kinase. *J. Virol.* **65**:3681-3692.
50. **Longnecker, R. and E. Kieff.** 1990. A second Epstein-Barr virus membrane protein (LMP2) is expressed in latent infection and colocalizes with LMP1. *J. Virol.* **64**:2319-2326.
51. **Longnecker, R., C. L. Miller, X. Q. Miao, B. Tomkinson, and E. Kieff.** 1993. The last seven transmembrane and carboxy-terminal cytoplasmic domains of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2 (LMP2) are dispensable for lymphocyte infection and growth transformation in vitro. *J. Virol.* **67**:2006-2013.

52. **Manet, E., H. Gruffat, M. C. Trescol Biemont, N. Moreno, P. Chambard, J. F. Giot, and A. Sergeant.** 1989. Epstein-Barr virus bicistronic mRNAs generated by facultative splicing code for two transcriptional trans-activators. *EMBO J.* **8**:1819-1826.
53. **Mann, K. P., D. Staunton, and D. A. Thorley-Lawson.** 1985. Epstein-Barr virus-encoded protein found in plasma membranes of transformed cells. *J Virol* **55**:710-720.
54. **Mannick, J. B., J. I. Cohen, M. Birkenbach, A. Marchini, and E. Kieff.** 1991. The Epstein-Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs is important in B-lymphocyte transformation. *J. Virol.* **65**:6826-6837.
55. **Marschall, M., F. Schwarzmans, U. Leser, B. Oker, P. Alliger, H. Mairhofer, and H. Wolf.** 1991. The BILF4 trans-activator of Epstein-Barr virus is modulated by type and differentiation of the host cell. *Virology* **181**:172-179.
56. **Marschall, M., Schwarzmans, F., Leser, U., Oker, B., Alliger, P., and Wolf, H.** Regulation und Funktion eines neuen Epstein-Barr-Virus Transaktivators. *Zbl.Bakt.Hyg.A.* 1990. Ref Type: Conference Proceeding
57. **Middleton, T. and B. Sugden.** 1992. EBNA1 can link the enhancer element to the initiator element of the Epstein-Barr virus plasmid origin of DNA replication. *J. Virol.* **66**:489-495.
58. **Miller, C. L., J. H. Lee, E. Kieff, A. L. Burkhardt, J. B. Bolen, and R. Longnecker.** 1994. Epstein-Barr virus protein LMP2A regulates reactivation from latency by negatively regulating tyrosine kinases involved in sIg- mediated signal transduction. *Infect. Agents Dis.* **3**:128-136.
59. **Mosialos, G., S. H. Hanissian, S. Jawahar, L. Vara, E. Kieff, and T. A. Chatila.** 1994. A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase, CaM kinase-Gr, expressed after transformation of primary human B lymphocytes by Epstein-Barr virus (EBV) is induced by the EBV oncogene LMP1. *J. Virol.* **68**:1697-1705.
60. **Nemerow, G. R. and N. R. Cooper.** 1984. Early events in the infection of human B lymphocytes by Epstein-Barr virus: the internalization process. *Virology* **132**:186-198.
61. **Nemerow, G. R., C. Mold, V. K. Schwend, V. Tollefson, and N. R. Cooper.** 1987. Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol* **61**:1416-1420.
62. **Prang, N., H. Wolf, and F. Schwarzmans.** 1995. Epstein-Barr virus lytic replication is controlled by a posttranscriptional mechanism of BZLF1. *J. Virol.* **69**:2644-2648.
63. **Pulvertaft, R. J. V.** 1964. Cytology of Burkitt's tumor (African lymphoma). *Lancet* **1**:238-240.
64. **Qu, L. and D. T. Rowe.** 1992. Epstein-Barr virus latent gene expression in uncultured peripheral blood lymphocytes. *J. Virol.* **66**:3715-3724.
65. **Rogers, R. P., M. Woisetschlaeger, and S. H. Speck.** 1990. Alternative splicing dictates translational start in Epstein- Barr virus transcripts. *EMBO J.* **9**:2273-2277.
66. **Roizman, B., L. E. Carmichael, F. Deinhardt, G. de The, A. J. Nahmias, W. Plowright, F. Rapp, P. Sheldrick, M. Takahashi, and K. Wolf.** 1981. Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* **16**:201-217.
67. **Rosa, M. D., E. Gottlieb, M. R. Lerner, and J. A. Steitz.** 1981. Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus- encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII. *Mol. Cell Biol.* **1**:785-796.
68. **Ruf, I. K., P. W. Rhyne, C. Yang, J. L. Cleveland, and J. T. Sample.** 2000. Epstein-Barr virus small RNAs potentiate tumorigenicity of Burkitt lymphoma cells independently of an effect on apoptosis. *J. Virol.* **74**:10223-10228.
69. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Manjatis.** 1989. *Molecular Cloning. A laboratory Manual* 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Press., Cold Spring.

70. **Sample, J., L. Brooks, C. Sample, L. Young, M. Rowe, C. Gregory, A. Rickinson, and E. Kieff.** 1991. Restricted Epstein-Barr virus protein expression in Burkitt lymphoma is due to a different Epstein-Barr nuclear antigen 1 transcriptional initiation site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:6343-6347.
71. **Sample, J., E. B. Henson, and C. Sample.** 1992. The Epstein-Barr virus nuclear protein 1 promoter active in type I latency is autoregulated. *J. Virol.* **66**:4654-4661.
72. **Sample, J., M. Hummel, D. Braun, M. Birkenbach, and E. Kieff.** 1986. Nucleotide sequences of mRNAs encoding Epstein-Barr virus nuclear proteins: a probable transcriptional initiation site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**:5096-5100.
73. **Sample, J., D. Liebowitz, and E. Kieff.** 1989. Two related Epstein-Barr virus membrane proteins are encoded by separate genes. *J. Virol.* **63**:933-937.
74. **Schwarzmann, F., N. Prang, B. Reichelt, B. Rinkes, S. Haist, M. Marschall, and H. Wolf.** 1994. Negative cis-acting elements in the distal part of the promoter of Epstein-Barr virus trans-activator gene BZLF1. *J. Gen. Virol.* **75**:1999-2006.
75. **Sears, A. E. and B. Roizman.** 1990. Amplification by host cell factors of a sequence contained within the herpes simplex virus 1 genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:9441-9444.
76. **Sharp, T. V., D. A. Raine, D. R. Gewert, B. Joshi, R. Jagus, and M. J. Clemens.** 1999. Activation of the interferon-inducible (2'-5') oligoadenylate synthetase by the epstein-barr virus RNA, EBER-1 [In Process Citation]. *Virology* **257**:303-313.
77. **Sinclair, A. J., I. Palmero, G. Peters, and P. J. Farrell.** 1994. EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *EMBO J.* **13**:3321-3328.
78. **Sixbey, J. W. and Q. Y. Yao.** 1992. Immunoglobulin A-induced shift of Epstein-Barr virus tissue tropism. *Science* **255**:1578-1580.
79. **Sugawara, Y., Y. Mizugaki, T. Uchida, T. Torii, S. Imai, M. Makuuchi, and K. Takada.** 1999. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) in hepatocellular carcinoma tissue: a novel EBV latency characterized by the absence of EBV-encoded small RNA expression. *Virology* **256**:196-202.
80. **Swaminathan, S., B. S. Huneycutt, C. S. Reiss, and E. Kieff.** 1992. Epstein-Barr virus-encoded small RNAs (EBERs) do not modulate interferon effects in infected lymphocytes. *J. Virol.* **66**:5133-5136.
81. **Tanner, J., J. Weis, D. Fearon, Y. Whang, and E. Kieff.** 1987. Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* **50**:203-213.
82. **Teramoto, N., L. Szekely, and G. Klein.** 1998. Differential expression and localization of EBER-1 and EBER-2 in Epstein-Barr virus-carrying cells. *J. Hum. Virol.* **1**:307-313.
83. **Tierney, R. J., N. Steven, L. S. Young, and A. B. Rickinson.** 1994. Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state. *J. Virol.* **68**:7374-7385.
84. **Toczyski, D. P., A. G. Matera, D. C. Ward, and J. A. Steitz.** 1994. The Epstein-Barr virus (EBV) small RNA EBER1 binds and relocalizes ribosomal protein L22 in EBV-infected human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**:3463-3467.
85. **Tomkinson, B. and E. Kieff.** 1992. Use of second-site homologous recombination to demonstrate that Epstein-Barr virus nuclear protein 3B is not important for lymphocyte infection or growth transformation in vitro. *J. Virol.* **66**:2893-2903.
86. **Tomkinson, B., R. Longnecker, K. Kaye, K. Izumi, C. Miller, J. Mannick, S. Swaminathan, F. Wang, J. Cohen, E. Kieff, and E. Robertson.** 1993. Definition of the minimal transforming EBV genome. XIII. International. Herpesvirus. Workshop, Juli. 25. 30.-30.

- 
87. **Urier, G., M. Buisson, P. Chambard, and A. Sergeant.** 1989. The Epstein-Barr virus early protein EB1 activates transcription from different responsive elements including AP-1 binding site. *EMBO J.* **8**:1447-1453.
  88. **Wang, D., D. Liebowitz, and E. Kieff.** 1985. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* **43**:831-840.
  89. **Wang, F., A. Marchini, and E. Kieff.** 1991. Epstein-Barr virus (EBV) recombinants: use of positive selection markers to rescue mutants in EBV-negative B-lymphoma cells. *J. Virol.* **65**:1701-1709.
  90. **Wang, F., S. F. Tsang, M. G. Kurilla, J. I. Cohen, and E. Kieff.** 1990. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivates latent membrane protein LMP1. *J. Virol.* **64**:3407-3416.
  91. **Yaswen, L. R., E. B. Stephens, L. C. Davenport, and L. M. Hutt Fletcher.** 1993. Epstein-Barr virus glycoprotein gp85 associates with the BKRF2 gene product and is incompletely processed as a recombinant protein. *Virology* **195**:387-396.
  92. **Yates, J., N. Warren, D. Reisman, and B. Sugden.** 1984. A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **81**:3806-3810.
  93. **Young, L., C. Alfieri, K. Hennessy, H. Evans, C. O'Hara, K. C. Anderson, J. Ritz, R. S. Shapiro, A. Rickinson, E. Kieff, and et al.** 1989. Expression of Epstein-Barr virus transformation-associated genes in tissues of patients with EBV lymphoproliferative disease. *N. Engl. J. Med.* **321**:1080-1085.

## Lebenslauf

**Norbert Greifenegger***Geboren am 16.12.1968***Ausbildung**

von 1975 bis 1979

**Grundschule Ecknach**  
*Ecknach*

von 1979 bis 1988

**Deutschherren-Gymnasium**  
*Aichach*  
Abitur

von 1990 bis 1997

**Universität Regensburg**  
*Regensburg*  
Vordiplom Chemie: 1992  
Diplom Chemie : 1997

von 1998 bis 2001

**Universität Regensburg**  
*Regensburg*  
Doktorand

von 1988 bis 1990

**Zivildienst**

---

## Veröffentlichungen und Kongresse

### Veröffentlichungen:

- **Norbert Greifenegger, Leoni A. Kunz-Schughart and Fritz Schwarzmann.** 2000. Purification of Virus-infected Cells: Enrichment of Epstein-Barr Virus-infected B Cells via a Virally Encoded, Late Lytic Cycle Glycoprotein. *Macs and More*.
- **Greifenegger, N., M. Jager, L. A. Kunz-Schughart, H. Wolf, and F. Schwarzmann.** 1998. Epstein-Barr virus small RNA (EBER) genes: differential regulation during lytic viral replication. *J. Virol.* **72**:9323-9328
- **Greifenegger, N.** 2001. Transcriptional regulation of small Epstein-Barr Virus-encoded RNA 1 (EBER-1) during latency and viral replication. (in Bearbeitung)
- **Greifenegger, N.** 2001. Localisation of the EBER-Genes during lytic replication. (in Bearbeitung)

### Kongresse:

- **Greifenegger, N. Bremen 1999.** Differentielle Regulation der Gene EBER-1 und EBER-2 des Epstein-Barr-Virus während der lytischen Replikation. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Virologie. Poster.
- **Greifenegger, N. Edinburgh 1999.** Epstein-Barr virus small RNA (EBER) genes: down regulation during the induction of lytic viral replication. European EBV-Meeting. Vortrag.
- **Greifenegger, N. Dresden 2001.** Localisation of Small Epstein-Barr virus-encoded RNAs (EBER-1 and EBER-2) During Viral Replication. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Virologie. Vortrag.
- **Greifenegger, N. Regensburg 2001.** Localisation of Small Epstein-Barr virus-encoded RNAs (EBER-1 and EBER-2) During Viral Replication. 26. International Herpesvirus Workshop. Vortrag.

## **Danksagung**

**Herrn Prof. Dr. Wolf** danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

**Herrn Prof. Dr. Wolfbeis** danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens.

**Herrn PD Dr. Fritz Schwarzmann** danke ich für seine Hilfsbereitschaft und die Anleitung bei diesem Projekt.

Den **LaborkollegInnen** danke ich für die Zusammenarbeit und die Unterstützung bei gemeinsamen Arbeiten.

Bei allen ArbeitsgruppenleiterInnen und Arbeitsgruppen und allen KollegInnen am Institut bedanke ich mich für das kollegiale und freundschaftliche Arbeitsklima.

Den Damen des Sekretariats möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und ihr freundliches Entgegenkommen danken.

Ein letzter Dank geht an die Damen und Herren aus der Nährboden- und Spülküche, deren Unterstützung ich zu schätzen wusste.